

**Untersuchungen
zum Gehalt an verfügbarem Lysin
in verschiedenen Futtermitteln**

1967

Kai-Christian Otte

Aus dem Institut für Tierphysiologie der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. Johannes Brüggemann

UNTERSUCHUNGEN ZUM GEHALT AN VERFÜGBAREM LYSIN IN
VERSCHIEDENEN FUTTERMITTELN

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung

der

veterinär-medizinischen Doktorwürde

der

Tierärztlichen Fakultät

der

Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Kai-Christian Otte

aus

Mosenberg

München

1967

Dekan:

Prof. Dr. A. Herrlich

Referent:

Prof. Dr. Dr. Johs. Brüggemann

Tag der Promotion:

27. 2. 1967



Karl-Christen Otto

München

1967

INHALT

	Seite
A. Einleitung	1
B. Besprechung der Literatur	3
1. Proteinqualität und Proteinbewertung	3
11. Proteinbewertung und essentielle Aminosäuren	3
12. Proteinqualität und Aminosäurenverfügbarkeit	4
13. Die Beeinflussung der Proteinqualität durch Hitzeeinwirkung	6
14. Die ernährungsphysiologische Bedeutung der Proteinschädigung	9
2. Die Bestimmung von verfügbarem Lysin mit Hilfe von Dinitrofluorbenzol	13
21. Prinzip der Bestimmung von verfügbarem Lysin	13
22. Die Reaktion des Proteins mit Dinitrofluorbenzol	14
23. Hydrolyse und Hydrolysenverluste	15
24. Trennung der im Hydrolysat enthaltenen DNP-Verbindungen	17
25. Extinktionsbereich	18
26. Übereinstimmung mit Ergebnissen aus Tierversuchen	19
27. Der Lysinbedarf der monogastrischen Nutztiere	20
3. Proteinqualität und Proteinbewertung bei den wichtigsten Eiweißfuttermitteln	21
31. Fischmehle	21
32. Tierkörpermehle	23
33. Magermilchpulver	25
34. Eiweißkonzentrate	27
C. Eigene Untersuchungen	29
I. Methodik	29
II. Ergebnisse und Diskussion	35

1.	Untersuchungen zur Methode	35
11.	Untersuchungen zum Problem der DNFB-Protein-Reaktion	35
12.	Untersuchungen zur Hydrolyse	37
13.	Untersuchungen zur Analysetechnik	40
131.	Lichteinfluß und Möglichkeiten einer Lagerung von Hydrolysaten	40
132.	Extinktionsbereich	40
133.	Reproduzierbarkeit; Wiederholungs- und Vergleichsstreuung	40
2.	Untersuchungen an Testgemischen aus kohlenhydrat- und lysinreichen Komponenten	42
3.	Der Gehalt an verfügbarem Lysin in verschiedenen Eiweißfuttermitteln	51
31.	Fischmehle	51
32.	Tierkörpermehle	55
33.	Magermilchpulver und Milchprodukte	59
34.	Eiweißkonzentrate	63
D.	Schluß	67
E.	Zusammenfassung	69

A. EINLEITUNG

Nach den heutigen Vorstellungen bedingt der Gehalt an verwertbaren essentiellen Aminosäuren die biologische Wertigkeit eines Proteins. Bei den zumeist gebräuchlichen Aminosäureanalysen bleiben jedoch wichtige Gesichtspunkte wie "Verdaulichkeit" oder "Verfügbarkeit" von Aminosäuren unberücksichtigt. Dies ist meist nur durch zeitraubende und kostspielige Tierversuche möglich.

Für eine rasche, routinemäßige Proteinbewertung von Eiweißfuttermitteln sollten dagegen Schnellmethoden zur Verfügung stehen, die Ergebnissen biologischer Versuche möglichst nahe kommen. Hierzu genügt vielfach der Nachweis einiger weniger Aminosäuren, die in ihrer Ergänzungswirkung auf das meist unausgeglichene Protein des Grundfutters den Wert eines Eiweißfuttermittels bestimmen. Zu den wertbestimmenden Aminosäuren gehört Lysin, das im Protein der wichtigsten Grundfuttermittel in zu geringer Konzentration vorhanden ist. Außerdem wird es leicht bei der Herstellung und Lagerung der Eiweißfuttermittel zerstört.

Basierend auf der Vorstellung, daß nur diejenigen Lysinanteile einer Polypeptidkette ernährungsphysiologisch "verfügbar" sind, deren ϵ -Aminogruppen frei sind, haben CARPENTER u. Mitarb. (1955 - 1960) eine chemische Bestimmung von "verfügbarem Lysin" ausgearbeitet. Ihre Methode bietet eine Reihe von Vorteilen, welche diese Analyse für Routinezwecke besonders geeignet machen (11, 18, 22).

B. BESPRECHUNG DER LITERATUR

1. Proteinqualität und Proteinbewertung

11. Proteinbewertung und essentielle Aminosäuren

Die Menge der am Proteinaufbau beteiligten essentiellen Aminosäuren und ihr Verhältnis zueinander bestimmen grundsätzlich den nutritiven Wert eines Eiweißes. Der Begriff der "essentiellen Aminosäure" wurde 1938 von W. C. ROSE (120) dahingehend festgelegt, daß damit eine Aminosäure bezeichnet wird, die vom Organismus nicht dem Bedarf entsprechend synthetisiert werden kann. Es gelingt dem Organismus dabei nicht, das erforderliche Kohlenstoffgerüst aufzubauen oder mit den charakteristischen Aminogruppen zu besetzen. Grundlegende Arbeiten zu diesem Problem hatten neben anderen bereits OSBORNE und MENDEL (104, 105, 106) durchgeführt.

MITCHELL und BLOCK (98) haben umfangreiche Studien zur Korrelation zwischen dem Gehalt eines Proteins an essentiellen Aminosäuren und seinem nutritiven Wert angestellt. Sie fanden eine enge Beziehung zwischen dem von ihnen aufgestellten sogenannten Chemical Score und der biologischen Wertigkeit eines Proteins oder mit der Gewichtsentwicklung von Versuchstieren (z. B. Protein Efficiency Ratio). Ihre Befunde wurden durch ähnliche Arbeiten anderer Autoren wiederholt bestätigt (z. B. 60, 107, 146). Aufbauend auf den Untersuchungen von MITCHELL und BLOCK entwickelte OSER (107) eine Methode zur Proteinbewertung, die nicht nur die an erster Stelle limitierende Aminosäure berücksichtigt, sondern alle essentiellen Aminosäuren des Testproteins zur Berechnung heranzieht. Sein "Essential-Amino-Acid-Index" (EAA-Index) ist das geometrische Mittel von Aminosäuren-Verhältniszahlen (auf Eiprotein als Standard bezogen). Der EAA-Index weist eine hohe Korrelation zur biologischen Wertigkeit des betreffenden Proteins auf ($r=0,95$). Bereits OSER betont jedoch, daß eine Voraussage der biologischen Wertigkeit mit Hilfe einer angegebenen Regressionsgleichung nur bei unveränderter Verfügbarkeit der Aminosäuren gelten kann.

Der Bedarf an essentiellen Aminosäuren ist je nach Tierart und Stoffwechsellaage des Organismus verschieden. Es muß daher bei der Beurteilung des EAA-Index stets beachtet werden, welcher Tierart und für welche Leistungen das Protein verabreicht werden soll (2, 3, 53). Aber nicht nur die essentiellen Aminosäuren sind hierbei zu berücksichtigen, sondern in gleicher Weise die nichtessentiellen Aminosäuren. Weiterhin ist das Verhältnis der essentiellen wie auch der nichtessentiellen Aminosäuren untereinander von großer Bedeutung, wie grundle-

gende Arbeiten zum Problemkreis des Aminosäurenantagonismus und der Aminosäurenimbalance nachweisen (44, 59, 101, 102, 136, 137). In solchen Fällen, oder wenn die Verfügbarkeit einzelner essentieller Aminosäuren größeren Schwankungen unterliegt, sind Methoden zur Proteinbewertung aus dem analytisch ermittelten Aminosäuregehalt nicht mehr zuverlässig (60, 102, 107).

12. Proteinqualität und Aminosäurenverfügbarkeit

Nur ein Teil des in der Nahrung enthaltenen gesamten Proteins ist "verdaulich". Davon sind wiederum nicht alle Aminosäuren "verfügbar", um den Bedarf des Organismus zu decken. Gewebeprotein ist oft schon aus strukturellen Gründen schlecht verdaulich. So wird z. B. manchmal die Wirksamkeit von Enzymen wegen der Sekundärfaltung von Peptidketten rein sterisch behindert, obwohl die entsprechenden Angriffspunkte im Molekül vorhanden sind (77, 111). Zu Strukturbesonderheiten gehört die Anzahl der relativ resistenten Peptidbindungen am Prolin oder Valin. Manche, besonders pflanzliche, Eiweißstoffe enthalten überdies Enzyminhibitoren, die eine Verdauungsarbeit erschweren. Sie kommen z. B. als Trypsininhibitoren in rohem Sojaschrot oder in der Milch vor. Ähnliche, verdauungshemmend wirksame Faktoren sind auch für weitere Leguminosen und andere Nahrungsmittel bekannt geworden (85, 94, 138).

Verschiedene Umstände behindern die Resorption schon freigesetzter Aminosäuren. Diese Vorgänge, wie die Beeinträchtigung der Aminosäurenresorption durch Kohlenhydrate oder andere Aminosäuren, tragen allgemein zum Problem des Aminosäurenantagonismus bei. Die von mancher Seite geäußerte Vermutung, es könnten neben Aminosäuren auch Peptide resorbiert werden, in denen zu fest verankerte Aminosäuren für eine intermediäre Ausnützung nicht verfügbar seien, ist nicht wahrscheinlich (47, 77).

Die intermediäre Proteinsynthese folgt einem "Alles - oder - Nichts - Gesetz" (17, 65, 148). Alle hierbei benötigten Aminosäuren müssen im richtigen Verhältnis gleichzeitig in der Zelle vorhanden sein. Erst dann erfolgt unter Matrizenwirkung der Ribonukleinsäure ein direkter Zusammenschluß der Aminosäuren zu dem jeweils spezifischen Eiweiß. Beim Fehlen nur einer einzigen essentiellen Aminosäure kann eine Proteinsynthese nicht erfolgen.

Durch zahlreiche Untersuchungen an Futtermitteln zur Proteinbewertung nach verschiedenen Methoden wurde eine qualitative Einstufung der einzelnen Eiweißquellen möglich. Dabei stellte sich allgemein eine Überlegenheit von tierischem Eiweiß über Protein pflanzlicher Herkunft heraus. Es fanden sich aber

auch innerhalb der Futtermittelarten überraschende Qualitätsunterschiede.

Die mindere Qualität der pflanzlichen Proteine ergibt sich hauptsächlich aus der Tatsache, daß Pflanzen zum Teil aus sehr einfachen Stickstoffquellen Proteine synthetisieren können. Sie kennen zumeist den Begriff einer essentiellen Aminosäure nicht. Pflanzen sind somit nicht auf eine optimale Zusammensetzung ihrer Reserveproteine angewiesen, die daher oft arm an für tierische Organismen essentiellen Aminosäuren sind (z. B. Endosperm des Getreides). Weiterhin sind die pflanzlichen Proteine häufig in feste, für monogastrische Tiere enzymatisch unangreifbare Zellwände eingeschlossen und aus diesem Grunde nicht verfügbar (3).

Das Problem einer Aminosäurenverfügbarkeit ist keineswegs nur auf pflanzliche Proteine beschränkt. Auch für tierisches Eiweiß sind heute viele Umstände bekannt, die eine verminderte Verwertbarkeit von Aminosäuren bedingen. Die besonders bei Proteinen tierischer Herkunft zur Konservierung und Verarbeitung notwendigen Maßnahmen beeinträchtigen die Verdaulichkeit in erheblichem Maße. Eine große Rolle spielt dabei die Hitzeeinwirkung, wie sie bei Sterilisation und Trocknung, beim Räuchern und Mahlen und als Selbsterhitzung infolge einer unsachgemäßen Lagerung auftritt.

Um Schlüsse auf die Verfügbarkeit bei einzelnen Aminosäuren ziehen zu können, haben, neben Fütterungsversuchen unter Verwendung kristalliner Aminosäuren (53, 54, 75, 137, 138), verschiedene Untersucher das Aminosäuremuster im Blutplasma herangezogen (31, 32, 36, 87). Allerdings ist die Methode zur Bestimmung der Verfügbarkeit von Aminosäuren über den Plasmaamino säurenspiegel für eine routinemäßige Proteinbewertung noch zu wenig standardisiert.

Auf mikrobiologischer Basis hat, unter anderen, J. E. FORD (1960-1964) eine Methode zur Bestimmung der Verfügbarkeit der einzelnen Aminosäuren ausgearbeitet. Dadurch wird es ihm möglich, viele der bisherigen Fehlerquellen auszuschalten (45, 46, 47): So zum Beispiel die säurehydrolytische Spaltung enzymresistenter Bindungen wie sie bei vielen chemischen Bestimmungsmethoden leider vorkommt. Die bisher bei mikrobiologischen Testen notwendige enzymatische Hydrolyse umgeht FORD durch die Verwendung neuer Testindividuen. Damit werden weitere Fehlerquellen ausgeschlossen, wie etwa eine Enzymhemmung durch Substratanhäufung in vitro. Die Teststämme (*Tetrahymena pyriformis* und *Streptokokkus zymogenes*) weisen dabei ähnliche Enzymaktivitäten und Bedarfsverhältnisse wie wachsende Ratten auf.

Mit dieser Methode ist es allerdings nicht möglich, die Verfügbarkeit von Lysin zu bestimmen, da für die benutzten Organismen Lysin nicht essentiell ist. Bei Lysin bietet sich infolge der strukturellen und reaktiven Sonderstellung eine chemische Bestimmung der Verfügbarkeit an (s. später).

13. Die Beeinflussung der Proteinqualität durch Hitzeeinwirkung

Generell führen hohe Temperaturen zur Verminderung des nutritiven Wertes von Nahrungs- oder Futtermitteln. Dabei ist nicht nur die Zerstörung wertbestimmender Bestandteile, sondern auch eine Veränderung der Schmackhaftigkeit, die Beeinträchtigung der Darmflora und vielleicht auch eine direkt toxische Wirkung durch entstandene Produkte zu beachten (77). Erhitzung muß jedoch nicht immer zu Einbußen am Nährwert führen. Eine Denaturierung durch mäßiges Erhitzen erleichtert vielfach die enzymatische Aufspaltung und damit die Verdaulichkeit des Proteins (119). Durch Sprengung von Wasserstoffbrücken, Salzbildung oder durch Auseinanderfallen von Peptidketten vermehrt sich die Zahl der reaktiven Gruppen im Proteinmolekül. Weiterhin sind die Inaktivierung von Enzyminhibitoren und die Zerstörung schädlicher Stoffe oder Keime durch eine Erhitzung bedeutsam (z. B. 85, 119, 138).

Bei stärkerer Hitzeeinwirkung setzt jedoch bald eine Zerstörung des Eiweißmoleküls ein. Hohe Temperaturen führen zur Verminderung der biologischen Wertigkeit von Proteinen durch Bildung enzymresistenter Verbindungen, Senkung der Gesamtverdaulichkeit sowie Zerstörung essentieller Aminosäuren (85). Als erste fanden McCOLLUM und DAVIS 1915 an erhitzter Milch den nachteiligen Effekt einer starken Temperatureinwirkung. Ihrer Beobachtung folgten später zahlreiche Arbeiten, die grundlegende Erkenntnisse über die hierbei ablaufenden chemischen Reaktionen und deren ernährungsphysiologische Konsequenzen erbrachten (34, 43, 49, 50, 58, 75, 77, 78, 79, 80, 81, 85, 109, 114, 119, 121).

Alle Teilreaktionen werden heute unter dem Überbegriff der "BRÄUNUNGSREAKTION" (browning reaction) zusammengefaßt. Sehr viele chemische Umsetzungen von organischem Material führen zu braunen oder schwarzen Produkten (Kompost, Humus, Torf, Kohle). Bei der küchenmäßigen Zubereitung unserer Nahrung treten "Bräunungsreaktionen" täglich auf. Sie sind für die Entwicklung eines spezifischen Aromas sogar von großer Bedeutung (8, 86). Dabei verhindern die vielseitig zusammengesetzte Kost und die über den Bedarf hinausgehende Proteinzufuhr das Auftreten von Mangelerscheinungen (70, 138, u. a.)

Unter den Bräunungsreaktionen ragen verschiedene Grundtypen heraus:

1. Oxydative Bräunung von Polyphenolen auf enzymatische oder nicht-enzymatische Weise. Diese Art wird häufig auf frischen Schnittflächen von Früchten beobachtet.

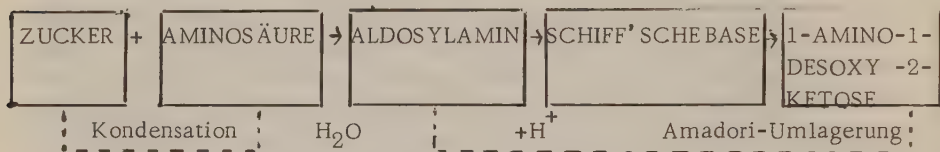
2. Nichtoxydative Bräunung durch Karamelisierung von Kohlenhydraten. Sie benötigt eine höhere Initialenergie und beginnt erst merklich bei Temperaturen über 100⁰ C. Unter den Begriff der nichtoxydativen Bräunung fällt auch die thermische Umwandlung der Proteine und ihrer Bausteine. Diese Reaktion erfordert ebenfalls höhere Temperaturen und endet in einem schwarzen "Thermomelanoid" (61). Zur nichtoxydativen Bräunung gehört weiterhin, neben der direkten Hitzespaltung von Aminosäuren, deren Inaktivierung durch die Verbindung freier Carboxylgruppen von Dicarbonsäuren mit freien Aminogruppen der basischen Aminosäuren (8, 85). Die entstandenen peptidähnlichen Bindungen können durch die zumeist substratspezifischen Proteasen nicht angegriffen werden. Hierzu gehören auch enzymresistente, doch säurehydrolysierbare Wasserstoff- und Schwefelbrücken innerhalb des Proteinverbands (34).

3. Die eigentliche Maillardreaktion ist der wichtigste und häufigste Typ unter den Bräunungsreaktionen. Im Gegensatz zu anderen nichtoxydativen Bräunungen verläuft sie auch schon bei niedriger Temperatur. Wesentliche Partner sind Aminosäuren und reduzierende Zucker mit ihren reaktionsfähigen Gruppen, den Aldehyd-(Aldosen) oder Ketogruppen (Ketosen) bei den Kohlenhydraten sowie den freien Amino- bzw. Sulfhydrylgruppen bei den Aminosäuren und Proteinen. Ihre verschiedenen starken Bräunungsaktivitäten sind im Grunde schon durch MAILLARD erkannt worden. Die Reihenfolge der Aminosäuren wird durch die am raschesten reagierenden basischen Aminosäuren (Lysin, Histidin, Arginin) angeführt, ihnen folgen Alanin, Glycin, Glutaminsäure, Sarkosin und Tyrosin. Bei den Kohlenhydraten sind die Pentosen am aktivsten. Es schließen sich Fruktose, Galaktose, Mannose, Glukose, Laktose und Maltose an. Saccharose bleibt am Reaktionsgeschehen unbeteiligt. In den Anfangsstadien verbinden sich die reaktionsfähigen Gruppen beider Komponenten im stöchiometrischen Verhältnis (34, 80).

Die Maillardreaktion läßt im wesentlichen drei Hauptstadien mit insgesamt sieben verschiedenen Reaktionsmöglichkeiten unterscheiden.

Hier sollen nur die Hauptstufen kurz erläutert werden, im übrigen sei auf die vortrefflichen Darstellungen von HEYNS und PAULSEN (61), von HODGE (62) sowie von GÖRNHARDT (51) verwiesen.

Das Initialstadium ist durch die Bildung farbloser, im ultravioletten Spektrum nicht absorbierender Produkte gekennzeichnet. In der Hauptsache wird es von der "Zucker-Amino-Kondensation" und der nachfolgenden "Amadori-Umlagerung" getragen.



In wäßrigen Medien verläuft die Kondensation nur langsam, doch mit zunehmendem Trockensubstanzgehalt steigert sich auch ihre Geschwindigkeit. Ihr Maximum erreicht sie bei einem Wassergehalt von 15 - 30 %, bei einem Wassergehalt unter 3 % kommt sie zum Stillstand (34, 51).

Nachdem sich die Ringform des Zuckers geöffnet hat, wandert die Aminogruppe zur Carbonylgruppe. Unter Wasseraustritt bildet sich ein Aldosyl- bzw. Ketosylamin. Dem schließt sich im Verlauf der Amadori-Umlagerung die Isomerisation zu einer 1-Amino-1-Desoxy-2-Ketose an. Die hierfür nötigen Protonen werden durch freie Carboxylgruppen geliefert (Aminosäurenkatalyse). Eine Blockierung dieser Umlagerungsreaktion hemmt den weiteren Verlauf der Bräunung (61, 62). Alle Teilreaktionen des Initialstadiums sind vom pH-Wert abhängig. Ihre Geschwindigkeit steigt mit abnehmender Wasserstoffionenkonzentration. Unter einem pH-Wert von 3 stagnieren sie ganz (34, 51).

Der Beginn des sogenannten Zwischenstadiums ist ohne stärkere Verfärbung der Produkte durch deren intensive Absorption im ultravioletten Wellenbereich (Maximum der Absorption: 285 - 290 m μ) charakterisiert (49, 58, 62). Die in diesem Stadium möglichen Reaktionen bestehen in der Mehrzahl aus der Bildung sogenannter Reduktone, aus einer Zuckerspaltung (Furfurolbildung) und einer Aminosäurenzerstörung durch Decarboxylierung (61).

Im Endstadium bilden sich als sogenannte Melanoide die eigentlich braunen Substanzen. Sie entstehen über ungesättigte, stark fluoreszierende Zwi-

schenstufen durch Aldolkondensation und Aldehyd-Amin-Polymerisation. Inhibitoren, wie etwa Natriumsulfit, verhindern zwar die Farbentwicklung weitgehend, vermehren aber die Fluoreszenzerscheinung und lassen die Aminosäurenverluste unbeeinflusst (50, 58).

Eine Bräunung kann gehemmt oder unterdrückt werden, indem man die für ihren Ablauf wesentlichen Carbonylgruppen inaktiviert oder entfernt (62). Weiterhin, wenn für ungünstige Reaktionsbedingungen gesorgt wird, zum Beispiel durch Senkung von Temperatur und pH-Wert oder durch Verminderung des Wassergehaltes. Eine Hemmung soll auch durch Zugabe von Schwefeldioxyd oder Merkaptan möglich sein (51, 62).

14. Die ernährungsphysiologische Bedeutung der Proteinschädigung

Neben der Zusammensetzung der Rohware sind für die Proteinqualität eines Futtermittels vor allem die Herstellungs-, Verarbeitungs- und Lagerungsbedingungen bedeutsam. Grundsätzlich können alle Aminosäuren während der Herstellung und Lagerung geschädigt werden. Glücklicherweise sind jedoch die meisten Aminosäuren mit ihren empfindlichen Aminogruppen im Proteinverband abgebunden und so geschützt. Lediglich die in jedem Gewebe frei vorkommenden Aminosäuren sind anfällig. Weiterhin ragen einige Aminosäuren mit funktionellen Gruppen aus der Proteinstruktur hervor und bilden so die charakteristischen reaktionsfähigen Stellen im Protein. Unter ihnen sind besonders freie Amino-, Carboxyl- und Sulfhydrylgruppen sowie der Imidazolring des Histidins wichtig. Die entsprechenden Aminosäuren zeichnen sich durch eine besondere Empfindlichkeit aus.

Aminosäurenverluste treten durch Inaktivierung und durch totale Zerstörung der Aminosäuren auf. Das Ausmaß der Schädigung ist sehr von der entsprechenden Aminosäure und der Art der jeweiligen Reaktion abhängig (43, 85, 93, 94, 138). Gänzlich zerstörte Aminosäuren haben ihren artspezifischen Charakter verloren, sie sind chemisch nicht mehr nachweisbar. Inaktivierte Aminosäuren sind jedoch häufig chemisch noch zu bestimmen, da die der chemischen Analyse vorausgehende Säurehydrolyse viele Reaktionen, die mit einer Inaktivierung der Aminosäuren verbunden sind, wieder rückgängig machen kann.

Die Reihenfolge der zumeist geschädigten Aminosäuren ist nicht immer gleich, immer sind jedoch Lysin, Cystin, Histidin und Arginin besonders betroffen. So fanden DONOSO und Mitarbeiter (34) sowie RAO und Mitarbeiter (114) Methionin, ROSS und KRAMPITZ (121) dagegen Arginin als am stärksten beein-

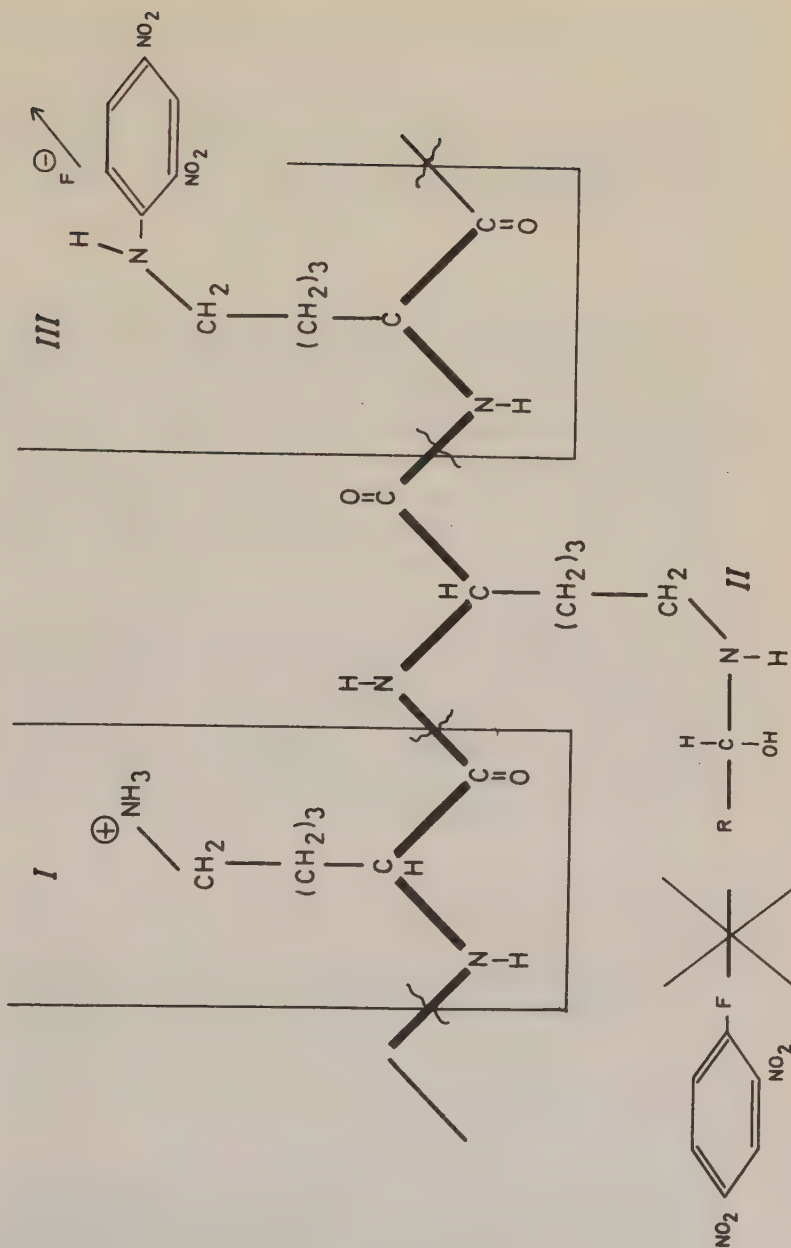
trächtigt. Von SCHOBER und PRINZ (127), MAURON und Mitarbeiter (93) sowie LEA, PATTON und Mitarbeiter (79, 80, 81, 109) und von ERBERSDOBLER und Mitarbeitern (38, 40) wird vor allem Lysin als die am meisten geschädigte Aminosäure genannt. Auch in den übrigen Literaturangaben waren stets hohe Lysinverluste vorhanden.

Das zu den basischen Aminosäuren gehörende Lysin (L - (+) - α - ϵ -Diamino - n - Capronsäure) ist aufgrund seiner ϵ -Aminogruppe, die frei aus dem Proteinverband hervorragt, besonders gefährdet. Die α -Aminogruppe des Lysins ist in der Peptidbindung geschützt. In Abb. 1 ist schematisch eine Peptidkette dargestellt, die vereinfacht aus 3 miteinander verknüpften Lysinmolekülen besteht. Das Lysinmolekül I besitzt noch eine freie reaktionsfähige ϵ -Aminogruppe, das Lysinmolekül III hat mit dem Dinitrofluorbenzol reagiert (s. später). Das Lysinmolekül II dagegen hat bereits die Maillardreaktion eingegangen und ist nicht mehr verfügbar für Dinitrofluorbenzol. Schon das erste Reaktionsprodukt des Lysins mit Kohlenhydraten oder freien Carboxylgruppen ist enzymresistent. Damit wird das Lysin auch für den Organismus unverfügbar (nicht ausnutzbar) (8, 43, 58, 93).

Das ist besonders schwerwiegend, da Lysin im Protein vieler Grundfuttermittel limitierend, das heißt in zu geringer Konzentration vorhanden ist (22, 54, 88). Dies trifft vor allem für die Cerealien zu (26, 65, 87). Eine hohe Ergänzungswirkung der Eiweißfuttermittel an Lysin ist daher sehr wichtig. Vielfach konnte deshalb auch eine Beziehung zwischen dem Lysingehalt in Eiweißfuttermitteln und der Ergänzungswirkung an Lysin auf das Protein der Grundfuttermittel gefunden werden.

Neben dem Lysin sind die schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin plus Cystin wertbestimmend, besonders wenn Eiweißfuttermittel als nahezu alleinige Eiweißquelle dienen, wie z. B. das Milchpulver in Milchaustauschern zur Kälberfütterung (93). Proteine, die zuwenig Methionin plus Cystin enthalten, sind zumeist auch lysinarm. Neben dem Methionin und Cystin wird bei der Herstellung und Lagerung, wie bereits besprochen, vor allem das Lysin geschädigt (38, 92, 93, 95, 96, 97). Aus dem Lysingehalt eines Eiweißfuttermittels kann daher auch auf den Gehalt an schwefelhaltigen Aminosäuren geschlossen werden.

Peptilkette (schematisch) mit 3 Lysinmolekülen.
Die freien ϵ -Aminogruppen haben verschieden reagiert.



2. Die Bestimmung von verfügbarem Lysin mit Hilfe von Dinitrofluorbenzol

Aufgrund der engen Beziehung des Lysingehalts zur Proteinqualität der Futtermittel wurden mehrfach chemische Analysenmethoden zur Bestimmung von verfügbarem Lysin entwickelt. Viele Untersucher gingen dabei von der Tatsache aus, daß die Lysinschädigung vor allem auf der Reaktionsfreudigkeit der freien ϵ -Aminogruppe basiert (58, 121).

Zuerst vermuteten SKRAUP und KAAS 1906 (zit. n. 122), daß die freien Aminogruppen eines Proteins zum Großteil die ϵ -Aminogruppen des Lysins seien. VAN SLYKE (135) konnte dies an Hand umfangreicher Untersuchungen bestätigen. Daher wurden in der Folgezeit viele Versuche unternommen, diese Aminogruppe zu markieren und nach einer hydrolytischen Aufspaltung des Materials nachzuweisen. Es seien hier nur die Orange-G-Bindungsreaktion und Lysin-Kupfer-Methoden erwähnt (55, 99, 133). Durch diese Verfahren war es aber bis heute nicht möglich, befriedigende Aussagen über die Proteinqualität eines Futtermittels zu erlangen.

Am erfolgreichsten waren zunächst GURIN und CLARKE (55), die Lysin als eine ϵ -mono-Benzyl-Sulfonyl-Kupferverbindung aus Gelatine isolieren konnten. ABDERHALDEN und STIX (1) verwendeten als Reagenz Dinitrochlorbenzol. Dinitrochlorbenzol reagiert aber nur beim Erhitzen mit dem Protein. Erst SANGER gelang 1945 eine befriedigende Markierung durch Verwendung von Dinitrofluorbenzol (DNFB). Er benützte diese von ihm später noch verbesserte Methode vor allem zur Aufklärung der Insulinstruktur (122, 123, 124).

Die DNFB-Methode wurde in der Folgezeit auf verschiedene Weise weiterentwickelt (4, 84, 112, 116, 133). Heute dient sie hauptsächlich zur Endgruppen- und Molekulargewichtsbestimmung sowie zur Kennzeichnung einer Amino- oder Sulfhydrylfunktion von Molekülen (48). Von CARPENTER und Mitarbeiter (11, 18, 22) wurde die Reaktion nach SANGER erstmals zur Bestimmung von Lysin und zur Proteinbewertung herangezogen.

21. Prinzip der Bestimmung von verfügbarem Lysin

Voraussetzung für eine exakte Bestimmung von Dinitrofluorbenzol-(DNFB-) verfügbarem Lysin ist eine quantitativ verlaufende DNFB-Protein-Reaktion und eine schonende säurehydrolytische Freisetzung der entstandenen Verbindungen.

Bei dem Verfahren nach SANGER markiert Dinitrofluorbenzol die im Proteinverband freie ϵ -Aminogruppe des Lysins. Durch salzsaure Hydrolyse wird das stark gelb gefärbte Dinitrophenyl-(DNP-)Lysin freigesetzt. Es ist, im Gegensatz zu den meisten anderen, nur schwach- oder ungefärbten DNP-Aminosäuren, wasserlöslich, so daß sich durch eine Ätherextraktion der Überschuß an DNFB-Abbauprodukten und die Mehrzahl der übrigen ätherlöslichen DNP-Aminosäuren entfernen lassen.

Ein Blindwert wird durch Reaktion einer Probe aus dem Hydrolysat mit Chlorkohlensäuremethylester gewonnen. Dadurch kann das nun ätherlösliche DNP-Lysin ebenfalls extrahiert werden. Gegen diese Blindprobe wird eine unbehandelt gebliebene, ätherextrahierte Hauptprobe im Photometer bei einer Wellenlänge von 360 m μ gemessen. Die Extinktionswerte vergleicht man mit denen eines Standards (ϵ -DNP-Lysinhydrochlorid) und berechnet daraus unter Berücksichtigung von Einwaagemenge und Verdünnung des Hydrolysats den Lysingehalt des Untersuchungsgutes. Extinktionsunterschiede von Doppelbestimmungen mit mehr als 5 % des höheren Wertes werden als signifikant angesehen (P 0,05).

ϵ -Aminogruppen, die bereits eine Maillardreaktion eingegangen haben, sind, im Gegensatz zu den meisten anderen Lysinbestimmungsmethoden, durch dies Verfahren nicht mehr analysierbar. Hierin liegt der besondere Vorzug der CARPENTER-Methode, da Lysin, das bereits durch die Maillardreaktion abgebunden wurde, auch für den Organismus nicht mehr verfügbar ist (s. Abb. 1). Dem Futter lose zugesetztes oder autolytisch bzw. enzymatisch freigesetztes Lysin ist nicht nachweisbar. Hierbei entsteht α - ϵ -Di-DNP-Lysin, das durch die Ätherextraktion verloren geht.

22. Die Reaktion des Proteins mit Dinitrofluorbenzol

Die DNFB-Protein-Reaktion ist nicht auf die freien Aminogruppen allein beschränkt, sondern erfaßt auch unbesetzte Phenol-, Hydroxyl- oder Imidazolgruppen (111). Die Verbindung von Dinitrofluorbenzol mit den Aminogruppen hat Ionencharakter und zeigt somit eine Abhängigkeit vom pH-Wert. In befriedigendem Maße verläuft die Reaktion nur in alkalischem Bereich, da OH-Ionen katalytisch wirksam sind (116). Unter Umständen können die DNFB-Moleküle aufgrund der räumlichen Proteinstruktur freie Aminogruppen nicht erreichen. Durch Denaturierung und die dabei eintretende sterische Umgestaltung wird die Anlagerung größerer DNFB-Mengen ebenso wie die Funktion der Verdauungsenzyme erleichtert (48, 100, 111). Hierin zeigt sich eine gewisse Parallelität der DNFB-Reaktion zur Verdaulichkeit der Proteine.

SANGER ist der Ansicht, daß unter den milden Bedingungen seiner Methode die nativen Verhältnisse im Protein im wesentlichen bewahrt bleiben (124). Übereinstimmend berichtet PORTER (111, 112) von einer gewissen Fixation der Molekularstruktur durch die Einwirkung von Dinitrofluorbenzol. Eine Denaturierung durch die methanolische Lösung von Dinitrofluorbenzol bei gleichzeitiger Zugabe der Natriumhydrogencarbonatlösung tritt kaum ein (111, 133).

Die zahlreichen Arbeiten und Empfehlungen für optimale Bedingungen bei der DNFB-Protein-Reaktion lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

Dauer: 1,5 bis 2,5, im Mittel 2 Stunden. Die Kopplung von Dinitrofluorbenzol an die Aminogruppen ist nach maximal zwei Stunden beendet. Eine Verlängerung der Reaktionsdauer auf das Vierfache ergibt keine zusätzliche Ausbeute an DNP-Lysin (84, 130). pH-Werte: 8 bis 11, im Mittel 9; Medium: wäßrige Natriumhydrogencarbonatlösung; Dinitrofluorbenzol in Methanol gelöst; DNFB-Menge: 0,3 ml/30-50 mg N. Empfohlen wird ein leichter Überschuß an Dinitrofluorbenzol, der bei kohlenhydratreichem Material einen schützenden Einfluß durch Inaktivierung oder Zerstörung reaktionsfreudiger Kohlenhydratgruppen entfalten soll (18, 57, 114). Zu große Mengen an Dinitrofluorbenzol sind jedoch wiederum ungünstig (48, 133). Die Reaktion zeigt eine lineare Abhängigkeit von der Temperatur (116). Bei Zimmertemperatur läuft sie innerhalb von zwei Stunden in befriedigendem Umfang ab (124). Während der Reaktionszeit sollen die Proben ständig mit Glasperlen (30, 130) leicht geschüttelt werden. Direkte Lichteinwirkung ist zu vermeiden (48, 133).

23. Hydrolyse und Hydrolysenverluste

Das Ausmaß einer hydrolytischen Spaltung hängt vor allem von der Konzentration der angewandten Säure sowie von Temperatur und Dauer der Hydrolyse ab. Dabei ändern sich die Verhältnisse in Abhängigkeit vom Substrat (Protein, Kohlenhydrat, Fett, usw.) und von den zu öffnenden Bindungen (35, 131). Die meisten Untersucher arbeiten mit salzsaurer Hydrolyse, doch werden auch Hydrolysegemische aus verschiedenen Säuren vorgeschlagen (127).

Bei der Auswahl der Hydrolysenbedingungen ist zu beachten, daß nicht alle Peptidbindungen gleich gut aufzuspalten sind. Dadurch werden die einzelnen Aminosäuren verschieden schnell frei (69, 84, 131). Um eine voll-

ständige Hydrolyse zu erreichen, ist daher oft eine Hydrolysenzeit nötig, bei der bereits erhebliche Verluste durch Zerstörung freier Aminosäuren möglich sind. Korrekturfaktoren lassen sich reproduzierbar nur für aufgetretene Verluste, nicht aber für eine unvollständige Freisetzung von Aminosäuren bestimmen (69). Nach den Untersuchungen von SCHROEDER (131) ist für die Freisetzung fast aller Aminosäuren eine Hydrolyse mit 6-normaler Salzsäure nach 24 Stunden ausreichend.

Ähnliche Verhältnisse gelten für die Hydrolyse des DNP-markierten Proteins. Obwohl die Zerstörung von DNP-Aminosäuren während der Hydrolyse an sich reproduzierbar ist, wechselt ihr Ausmaß für jedes Untersuchungsmaterial. CARPENTER und andere Untersucher empfehlen, für jedes Untersuchungsmaterial eine Probe zusammen mit einer bekannten Menge DNP-Lysin zu hydrolysieren. Aus den Ergebnissen solcher Versuchsreihen kann für jedes Untersuchungsmaterial ein Korrekturfaktor errechnet werden (22, 48).

Die Stabilität der DNP-Aminosäuren während der Hydrolyse ist bei den einzelnen Aminosäuren verschieden. SCHRAMM (130) fand in seinen Untersuchungen DNP-Valin am widerstandsfähigsten, während DNP-Prolin schon verhältnismäßig rasch zerfiel. Größere Zerstörungen an der relativ resistenten DNP-Lysin-Verbindung werden erst bei Anwesenheit höherer Mengen an Tryptophan, Cystin und vor allem an Kohlenhydraten beobachtet (48, 69, 130). Die Konzentration an Cystin und Tryptophan ist insgesamt in Proteinen tierischer Herkunft nur gering, dürfte somit keine wesentliche Rolle spielen.

Der größte Teil der Aminosäurenverluste scheint in den ersten Stunden der Hydrolyse während der Trennung der Peptidbindungen einzutreten (48, 131). Nach Angaben in der Literatur (69, 110) und nach eigenen Erfahrungen ist für die Freisetzung von DNP-Lysin eine Hydrolysenzeit von 16-18 Stunden ausreichend (bei 6 n Salzsäure).

Die Hauptschwierigkeit für eine Bestimmung von DNFB-verfügbarem Lysin in stark kohlenhydrathaltigen Futtermitteln stellt die Zerstörung von DNP-Lysin durch Abbauprodukte des Dinitrofluorbenzols und des Kohlenhydratanteils dar. Weiteren Einfluß haben farbige Verbindungen, die während der Hydrolyse entstehen und sich nur teilweise oder schwer aus dem Hydrolysat entfernen lassen (z. B. sogenannte Huminsubstanzen).

Zur Verringerung der Aminosäurenverluste bei Anwesenheit größerer Mengen Kohlenhydrate empfehlen manche Autoren ein weites Salzsäure-Substrat-Verhältnis. Diese Maßnahme beeinträchtigt die Proteinhydrolyse nicht, vermag

aber den ungünstigen Einfluß der Kohlenhydrate zu mindern (12, 73, 89, 90, 102, 119). Als ausreichend wird zumeist ein Verhältnis von 40 mg Stickstoff zu 100 ml Säure angesehen (102). Unter diesen Verhältnissen sollen weder freie noch proteingebundene Aminosäuren, selbst bei Anwesenheit großer Kohlenhydratmengen nach 24-stündiger Salzsäurehydrolyse negativ beeinflusst werden (73). Tryptophan und Cystin werden allerdings weitgehend zerstört.

Der Umfang der Huminbildung ist von der angewandten Temperatur und der Dauer ihrer Einwirkung, sehr stark aber von der Salzsäurekonzentration abhängig. Huminsubstanzen entstehen bevorzugt bei hoher Wasserstoffionenkonzentration. Ihre Entwicklung läßt sich ebenfalls wirksam durch ein weites Salzsäure-Substrat-Verhältnis unterdrücken. Das Auftreten von Huminstoffen und die braune Verfärbung des Hydrolysats sind weitgehend eine Frage der progressiven Karamelisierung vorhandener Kohlenhydrate (73). Verantwortlich für auftretende Aminosäurenverluste, und anfänglich nicht immer an eine Farbentwicklung gebunden, ist die Bildung von Proteinmelanoiden oder Protein-Kohlenhydrat-Huminen.

Die Zerstörung von DNP-Lysin und die Bildung farbiger Nebenprodukte lassen sich somit am besten durch ein optimales Salzsäure-Substrat-Verhältnis vermindern. Andere, verschiedentlich hierfür vorgeschlagene Wege, wie die Entfernung der Kohlenhydrate durch enzymatische Verdauung vor der Proteinhydrolyse oder die Verwendung von schützenden Substanzen (wie z. B. Thio-Di-Glykolsäure) sind zumeist umständlich und wenig befriedigend (72, 89, 90, 143).

24. Trennung der im Hydrolysat enthaltenen DNP-Verbindungen

Einleitend erfolgt immer eine Ätherextraktion des Hydrolysats. Dadurch können der Überschuß an Dinitrofluorbenzol und seine Abbauprodukte sowie die Mehrzahl der übrigen DNP-Aminosäuren (freie, andere basische und endständige Aminosäuren) entfernt werden. Es ist dabei unbedingt auf die Verwendung eines metall- und peroxydfreien Äthers zu achten. Während bei der CARPENTER-Methode die in der wäßrigen Phase zurückbleibenden DNP-Aminosäuren, vor allem das Lysin, bestimmt werden, schlagen andere Autoren die noch mehr spezifische chromatographische Abtrennung des Lysins vor (z. B. 4, 48, 115).

Bei dem Verfahren nach CARPENTER werden DNP-Ornithin, endständiges DNP-Tyrosin und DNP-Hydroxylysin als "DNP-Lysin" gemessen (22).

Eventuell vorhandenes Di-DNP-Histidin ist schwer ätherlöslich, deswegen sollte öfter extrahiert werden. Mono-DNP-Histidin, das an sich farblos ist (112), wird bei der Reaktion mit Chlorkohlensäuremethylester leicht gelb gefärbt, ist aber nur zum Teil ätherlöslich. Es ergeben sich daraus scheinbare Mindergehalte an Lysin. Ein Gehalt von 2 % Histidin im Untersuchungsgut "verringert" so den Gehalt an DNFB-verfügbarem Lysin um 0,06 %. Durch Zugabe von Natriumsulfid oder Messung der Extinktion bei verschiedenen Wellenlängen, läßt sich dieser Fehler ausschalten (11, 12). Neuerdings wird empfohlen, Chlorkohlensäuremethylester nicht zu verwenden, da sich hierdurch der systematische Fehler am niedrigsten halten lasse (83). Hydroxylysin, das ohne physiologische Lysinwirksamkeit ist, wird voll als Lysin gemessen (35). Allerdings kommt Hydroxylysin nur im Kollagen vor. Bei dem geringen Gehalt des Kollagens an Hydroxylysin (etwa 1 % im Protein) und bei einem Kollagenanteil im Futter von etwa 30 % (z. B. Tierkörpermehl) ist der dadurch entstehende Fehler nur gering (unter 5 %).

Die bei der Hydrolyse entstehenden und sich in Gegenwart von Kohlenhydrat vermehrt bildenden Abbauprodukte von überschüssigem Dinitrofluorbenzol und von DNP-Aminosäuren können mitunter fehlerhafte Extinktionswerte ergeben. Dinitrophenol als DNFB-Derivat und das beim Zerfall der meisten DNP-Aminosäuren entstehende Dinitroanilin sind zwar ätherlöslich, werden aber nur bei sorgfältiger Extraktion restlos entfernt (48, 115, 130).

25. Extinktionsbereich

Allgemein ist für die Wahl des Extinktionsbereichen allein das Extinktionsmaximum der zu bestimmenden Substanz maßgebend. Während CARPENTER und Mitarb. bei einer Wellenlänge von 435 m μ messen, empfehlen FRAENKEL-CONRAT und andere Autoren (37, 48, 127) die Bestimmung bei 360 m μ auszuführen. Die Gründe, die CARPENTER u. Mitarb. veranlassen, die Analysenwerte bei 435 m μ zu ermitteln, sind nicht näher bekannt. Sie dürften aber in der Tatsache liegen, daß die DNP-Lysinlösung intensiv gelb gefärbt ist (die Absorption des gelben Lichtes erfolgt etwa bei der Wellenlänge 435 m μ). Zum anderen wird in diesem Extinktionsbereich die Mitbestimmung von DNP-Tyrosin ausgeschaltet (115, 132, 133). Außerdem ist die Bestimmung im sichtbaren Wellenbereich mit einem einfachen Photometer (Blaufilter) durchzuführen, während die Bestimmung bei 360 m μ hochwertigere Geräte erfordert.

Sehr viele Autoren gehen davon aus, daß Analysenfehler im Bereich des Extinktionsmaximums am niedrigsten sind. Das Extinktionsmaximum aller

DNP-Verbindungen in alkalisch-wäßriger Lösung liegt bei $362 \pm 2 \text{ m}\mu$ (48, 130). Ihre Extinktionsrate ist oft vom pH-Wert abhängig. So verschwindet die Extinktion von Dinitrophenol beim Ansäuern der Lösung aus dem $360 \text{ m}\mu$ -Bereich, während sich der Extinktionswert von DNP-Lysin davon unabhängig zeigt (30, 69). (Der pH-Wert der bei der CARPENTER-Methode zur Extinktion kommenden Proben liegt bei 0,8 bis 0,9). Eine Gegenüberstellung von Meßwerten bei den Wellenlängen " $435 \text{ m}\mu$ " und " $360 \text{ m}\mu$ " zeigt, daß die Bestimmungen im Bereich des Absorptionsmaximums eine größere Analysengenauigkeit zulassen (110).

Der störende Extinktionseinfluß von Huminen (57, 115) wird durch den Blindwert berücksichtigt. Die Höhe des Blindwertes kann als Anhaltspunkt für das Ausmaß einer Analysenbeeinflussung durch Kohlenhydrate dienen. Bei kohlenhydratreichen Proben ist die Extinktion des Blindwertes mehr als verdoppelt. Dies ist nicht überraschend, da bei der Maillardreaktion Substanzen entstehen, die im ultravioletten Wellenbereich absorbieren.

26. Übereinstimmung mit Ergebnissen aus Tierversuchen

Aus zahlreichen Untersuchungen geht hervor, daß in Futtermitteln fast immer nur Lysin und Methionin plus Cystin limitierend sind (10, 46, 60, 95, 96, 147). Die Bestimmung nur einer dieser Eckamino-säuren würde daher einen beträchtlichen Fortschritt bei der routinemäßigen Proteinbewertung darstellen. Dies um so mehr, als in den meisten tierischen Proteinen das gegenseitige Verhältnis der essentiellen Aminosäuren weitgehend konstant ist (39). Aus dem Gehalt an einer wertbestimmenden Aminosäure, z.B. Lysin, ist daher auch ein gewisser Rückschluß auf die übrigen essentiellen Aminosäuren möglich.

Entsprechend der praktischen Bedeutung der Dinitrofluorbenzolmethode für eine schnelle Qualitätskontrolle von Futtermitteln, wurden in den vergangenen Jahren zahlreiche Arbeiten veröffentlicht, die sich mit der Überprüfung der Bestimmungsmethode für DNFB-verfügbares Lysin durch Tierversuche beschäftigt haben. So berichten CARPENTER u. Mitarb. (19, 20, 23, 25) von einer guten Korrelation der Gehaltswerte an verfügbarem Lysin für Fischmehl, Erdnußkeks, Blutmehl und andere Proteinkonzentrate mit Ergebnissen aus Fütterungsversuchen an Küken. Ähnliche Befunde veröffentlichten ERBERSDOBLER und ZUCKER (39) für Rattenversuche mit Fischmehl, KELLENBERGER (71), LEA u. Mitarb. (83) sowie ERBERSDOBLER und ZUCKER (39) für "Gross Protein Value"-(GPV-) Bestimmungen an Fischmehlen. ERBERSDOBLER u. Mitarb. (38) konnten unter anderem für die an Ratten mit Modellgemischen aus Fleisch ermittelten Werte eine ähnliche Übereinstimmung finden.

27. Der Lysinbedarf der monogastrischen Nutztiere

Zum Verständnis des Folgenden sei auf den Lysinbedarf der monogastrischen landwirtschaftlichen Nutztiere kurz eingegangen. Hierbei ist es nicht möglich, die gesamte Problematik des Aminosäurenbedarfs aufzuzeigen.

Der Lysinbedarf ist bei allen synthetischen Leistungen hoch. Entsprechend dem hohen Gehalt des Körpergewebes, der Milch oder des Eiproteins an Lysin wird es bei Wachstum, Fortpflanzung und Laktation besonders benötigt. Junge wachsende Organismen benötigen mehr Lysin als erwachsene. Die Wachstumsgeschwindigkeit ist hierbei sehr bedeutsam. Mit steigendem Proteinangebot nimmt der Lysinbedarf zu, allerdings nicht proportional (52). Einen entscheidenden Einfluß hat die Futteraufnahme und damit der Energiegehalt der Ration (52, 101, 146). Auch die Art der gleichzeitig verabreichten Kohlenhydrate wirkt sich auf Ausnutzung und Bedarf von Aminosäuren aus (26, 54, 146). Bedarfswerte sind weiterhin stets unter Berücksichtigung des gesamten Aminosäurenmusters und eventueller Antagonismen oder Imbalancen zu betrachten (59, 67, 68). Grundsätzlich scheint für die Fütterung der monogastrischen Nutztiere ein Lysingehalt des Futters, bezogen auf das Protein, von 4,5 - 5,5 % auch für hohe Leistungen ausreichend zu sein.

3. Proteinqualität und Proteinbewertung bei den wichtigsten Eiweißfuttermitteln

31. Fischmehle

Die Schwierigkeiten bei einer Qualitätsbeurteilung für Fischmehl sind außerordentlich groß, weil der Futterwert durch die gesetzlich geforderten Angaben (Protein-, Salz-, Fett- und Sandgehalt) nicht ausreichend charakterisiert wird (Futtermittelgesetz (FMG) vom 22. 12. 1922, 2. Verordnung zur Ausführung des FMG vom 21. 07. 1927, Ministerialerlaß zum FMG von 1931, Richtlinien der wirtschaftlichen Vereinigung der Fischindustrie Deutschlands vom 26. 01. 1935).

Zu den wertbestimmenden Bestandteilen sind aus ernährungsphysiologischer Sicht in erster Linie der Gehalt an verfügbaren essentiellen Aminosäuren sowie an Vitaminen und Mineralstoffen zu zählen. Weiterhin rechnet man einen sogenannten "Fischfaktor" hinzu (UGF-Unspecific Growth Factor) (6). Die biologische Wertigkeit von Fischmehlprotein liegt meist zwischen 70 und 90.

Der Nährwert des Fischmehles unterliegt großen Schwankungen, die in der Hauptsache durch das Rohmaterial, die Herstellungsmethoden und durch die Umstände bei Lagerung und Transport bestimmt werden. Im Vergleich dazu sind die Unterschiede hinsichtlich der Proteinqualität innerhalb verschiedener Fischarten nur gering (141). Das entsprechende Fischmehl kann aus ganzen Fischen oder nur aus Rückständen der Fischverarbeitung (z. B. Filetierrückständen) hergestellt worden sein. Dementsprechend unterschiedlich ist auch der Grätenanteil der Mehle und damit deren Gehalt an Asche und an kollagenem Eiweiß. Der Anteil an Glycin, Prolin und Arginin ist in solchen Fischmehlen erhöht, der Gehalt an Lysin und anderen essentiellen Aminosäuren dagegen erniedrigt (15, 20). Der Beifanganteil und der Gehalt an sogenannten Preßsäften spielen qualitätsbestimmend ebenfalls eine große Rolle. Jahreszeitlichen Schwankungen unterliegen vor allem der Fettgehalt und der Anteil an Pentosen (Milchner). Beide bedingen eine unterschiedliche Lagerungsfähigkeit der Fischmehle.

Bei Zersetzung des Eiweißes während einer Fäulnis geht ein beträchtlicher Verlust an Nährstoffen vor sich (141). Dabei entstehende schädliche Stoffe und Organismen werden durch die Mehلبereitung weitgehend zerstört, sodaß sich noch brauchbare Produkte ergeben (140).

Bei den verschiedenen Herstellungsverfahren ist weniger die Art der Trocknung (Feuer-, Dampf-, Luft- oder Vakuumtrocknung) als vielmehr die

Höhe der dabei angewandten Temperaturen und die Dauer ihrer Einwirkung entscheidend. BISSETT, TARR u. a. berichten vom günstigen Einfluß leichter Erhitzung auf die Verwertbarkeit und Lagerungsfähigkeit der Fischmehle (7, 82, 140). Bei Temperaturen bis 100° C werden keine nennenswerten Qualitätseinbußen beobachtet (150). Stärkeres Erhitzen führt jedoch zu einer hochgradigen Verringerung durch verminderte Gesamtverdaulichkeit des Proteins und Verluste an essentiellen Aminosäuren (68, 96, 97, 145). Neben Lysineinbußen treten vor allem Verluste an Cystin, Methionin und Threonin auf (7, 96, 97, 138). Dabei ist eine Parallelität zwischen Lysinverlusten und der Zerstörung schwefelhaltiger Aminosäuren vorhanden.

TARR und Mitarbeiter (139, 140) und BISSETT und TARR (7) machen für die Lysinverluste hauptsächlich eine Maillardreaktion zwischen freien Pentosen und der ϵ -Aminogruppe verantwortlich. Nach Ansicht von CARPENTER und Mitarbeiter (24, 25) sowie LEA und Mitarbeiter (82, 83) reicht der niedrige Kohlenhydratgehalt der Fischmehle nicht aus, um die oft beträchtliche Aminosäureschädigung zu erklären. Sie unterscheiden grundsätzlich zwischen einem oxydativen Reaktionstyp, der bei niedrigen Temperaturen abläuft und einem nichtoxydativen, an hohe Temperaturen gebundenen Typ. Beide sind in ihrem Ausmaß vom Wassergehalt abhängig und haben bei 12 bis 14 % Wasseranteil der Mehle ihr Reaktionsoptimum.

Die Menge des im Fischmehl enthaltenen Rohfetts bestimmt wegen des hohen Anteils an Polyensäuren den Umfang der Reaktionen vom oxydativen Typ. Die anfänglich stöchiometrisch verlaufende Bindung der ϵ -Aminogruppe durch Abbauprodukte oxydierter Öle bekommt später Polymerisations- und Kondensationscharakter. Hier liegt also eine der Maillardreaktion ähnliche Aminosäureschädigung vor. Sie verläuft jedoch sehr viel langsamer und ist von der Anwesenheit von Sauerstoff abhängig.

Der nichtoxydative Reaktionstyp ist an höhere Temperaturen gebunden. Er führt zu intramolekularen Verbindungen der Aminogruppen mit allen reaktionsfähigen Hydroxylgruppen (24, 25, 82, 83, 136). Eine Abtrennung der Aminosäure von ihrem Kondensationspartner gelingt enzymatisch nicht mehr.

Bei Lagerung von Fischmehlen hat vor allem der oxydative Reaktionstyp praktische Bedeutung. Durch Oxydation ungesättigter Fettsäuren wird eine Selbsterhitzung der Mehle bedingt. Dabei können infolge ungünstiger Lagerung allerdings Temperaturen erreicht werden, bei denen auch nichtoxydative Reaktionen eintreten. Alle Maßnahmen zur Stabilisierung der Fischmehle zie-

len auf die Verhinderung der vorwiegend in den ersten Lagerungswochen ablaufenden Fettoxydation ab (82). Neben die früher üblichen Maßnahmen, wie leichtes Erhitzen, Preßsaßzugabe oder abgesackte, luftige Stapelung scheint in absehbarer Zeit der Einsatz sogenannter "Antioxydantien" zu treten (13, 24, 83).

Obwohl Fischmehl so reichlich Lysin enthält, daß es selbst nach schwerer Proteinschädigung für den Bedarf monogastrischer Nutztiere noch ausreicht, ist der Gehalt an Lysin für die praktische Fütterung sehr wichtig. Fischmehl wird unvermischt und als Hauptkomponente in "Eiweißkonzentraten" als Ergänzungsfuttermittel für Schweine und Geflügel verwendet. Der Ergänzungswert von Fischmehl wird hauptsächlich durch seinen Lysingehalt bestimmt. Je geringer dabei der Fischmehlanteil am Gesamtprotein des Futters ist, desto stärker treten eventuell vorhandene Qualitätsunterschiede hervor. Der Ergänzungswert ist um so größer, je geringer der Lysingehalt der Grundration ist (10, 136, 144).

32. Tierkörpermehle

Laut § 59 der "Zweiten Verordnung zur Ausführung des Futtermittelgesetzes vom 21. 07. 1927" sind Tierkörpermehle "mit gespanntem Wasserdampf getrocknete und gemahlene Tierkörper, Fleischabfälle der Tierkörperverwertungsanstalten und Schlachthofabfälle". Sie werden in diesen Begriffsbestimmungen klar von Fleischfuttermehlen (§ 53) getrennt. Die Hauptunterschiede liegen im Gehalt an Asche und phosphorsaurem Kalk, in der Wahl des Rohmaterials sowie in dessen Verarbeitung. Fleischfuttermehle können nur aus gesunden Tieren und deren Fleischabfällen hergestellt werden. Sie bedürfen daher nicht der im Tierkörperbeseitigungsgesetz vom 01. 02. 1939 geforderten "ausreichenden Erhitzung bis zum Zerfall der Weichteile (30 Min./130° C)". Durch diese Erhitzung und den daraus resultierenden Verlusten an Aminosäuren sowie durch das minderwertigere Rohmaterial wird die Unterlegenheit von Tierkörpermehlen gegenüber Fleischfuttermehlen verursacht.

Tierkörpermehle sind Produkte von sehr schwankendem Futterwert. Der Rohproteingehalt ist umgekehrt proportional zum Ascheanteil, da beide hauptsächlich durch die Art des Rohmaterials bestimmt werden. Dagegen hängt der Fettgehalt besonders vom Herstellungsverfahren ab (76, 108, 142).

Unter den zur Verarbeitung kommenden Rohmaterialien sind zu unterscheiden:

1. Gefallene Tiere, jedoch ohne Haut, Hörner, Hufe, Klauen, Magen- und Darminhalt. Da hierbei die Knochen mit vermahlen werden, zeichnen sich diese Mehle durch einen hohen Gehalt an Asche und Leimstickstoff aus.
2. Konfiskate und Schlachthofabfälle. Sie liefern Produkte mit hohem Rohproteingehalt.
3. Schlachtblut, das zu Futterblutmehl und Blotalbumin (technischer Klebstoff) verarbeitet wird.

Um die durch unterschiedlichen Materialanfall bedingten Qualitätsschwankungen auszugleichen, sollten Mehle verschiedener Herkunft vermischt werden (108). Teilweise kommen auch weitgehend autolytierte Kadaver zur Verarbeitung. Außer Lysinverlusten (33) sind nach der Aufbereitung solcher Tierkörper keine gesundheitsschädlichen Auswirkungen nachweisbar (108).

In der Bundesrepublik sind heute drei verschiedene Herstellungsverfahren üblich:

1. Naßverfahren: Hierbei wirkt überhitzter Wasserdampf (130 - 160^o C) direkt auf das Material ein. Es liefert Mehle mit dem geringsten Futterwert, da die anschließende Trocknung zu lange dauert und die Endprodukte einen zu hohen Fettgehalt aufweisen. Diese Mehle haben den niedrigsten Proteingehalt sowie eine schlechtere Verdaulichkeit und Lagerungsbeständigkeit (76, 118, 142).
2. Trockenverfahren: Die Tierkörper werden im Eigenwasser aufgeschlossen. Bei dieser Methode stört ebenfalls der zu hohe Fettgehalt, der sich wie beim Naßverfahren durch Pressen oder Zentrifugieren meist nicht in befriedigender Weise senken läßt.
3. Extraktionsverfahren lassen sich mit den beiden vorher genannten Techniken koppeln. Hierbei wird der hohe Fettanteil durch Extraktion des aufgeschlossenen Materials mit Perchloräthylen entfernt. Das Extraktionsverfahren gestattet durch eine genaue Regulierung des Fettanteils die Herstellung der besten Tierkörpermehle (142).

Die häufig noch hohe Bewertung von Tierkörpermehl als Eiweißfuttermittel tierischer Herkunft war früher eher gerechtfertigt, da es nicht unwesentlich zur Mineralstoffversorgung der Nutztiere beitrug und anderes hochwertiges Eiweiß noch nicht verfügbar war. Der Rohproteingehalt sollte als der eigentliche

Wertfaktor laut 1. VO zum Tierkörperbeseitigungsgesetz mindestens 50 % betragen. Er schwankt nach Angaben der Literatur von 42 bis 75 %. Durchschnittlich 10 % des Proteins sind nicht eiweißartige Stickstoffverbindungen. RICHTER, v. OSTERTAG und andere geben die Stickstoffverdaulichkeit von Tierkörpermehl mit durchschnittlich 85 % an (108, 118). Eine Proteinverdaulichkeit in Höhe von mindestens 85 % wird auch gesetzlich gefordert (1. VO zum TKBG).

Aufgrund des Ausgangsmaterials stellt Kollagen meist einen beträchtlichen Teil des Gesamtproteins dar (20-50%). Kollagen ist aber wegen seines Mindergehaltes an allen essentiellen Aminosäuren, besonders an Tryptophan und Cystin, von sehr geringer Proteinqualität (38, 125). Weiten Schwankungen unterliegen daher die Aminosäuregehalte. Als Hauptursache für die mindere Qualität des Tierkörperproteins wird somit die insgesamt unausgeglichene Aminosäurezusammensetzung angesehen (27, 36). Die mittlere biologische Wertigkeit von Tierkörpermehlen beträgt "40".

In geringen Anteilen (3-5% des Rationsproteins) können Tierkörpermehle jedoch gut verwendet werden (108). Dies trifft besonders für die Geflügelütterung zu, wenn vorwiegend pflanzliche Eiweißfuttermittel eingesetzt werden. Hier hat die Ergänzungswirkung der Tierkörpermehle an Glycin und Arginin besondere Bedeutung. Der Lysingehalt wird mit 4, 5-6, 5g/16 g N angegeben (91, 113). Da er, in Abhängigkeit von der angewandten Hitze sowie dem Wasser- und Fettgehalt, sehr großen Schwankungen unterliegt, ist eine Ergänzungswirkung an Lysin kaum vorhanden (27, 33, 118).

Beim Einsatz von Futterblutmehlen in der Fütterung ist ihr relativer Isoleucinmangel zu berücksichtigen. Hervorzuheben ist der hohe Lysingehalt und damit die gute Ergänzungswirkung auf lysinarme Rationen (14, 74).

33. Magermilchpulver

Dem Paragraphen 2 f der 1. Verordnung zur Durchführung des Milchgesetzes (15.5.1931) ist die amtliche Definition für den Begriff "Magermilchpulver" zu entnehmen. Der Gesetzgeber erwähnt darin zwei verschiedene Herstellungsmethoden:

1. Sprühverfahren - "... mittels Zerstäubung im warmen Luftstrom ..."
2. Walzenverfahren - "... unter Anwendung von heißen Walzen ..."

Als Qualitätsmerkmal wird nur die Höchstgrenze für den Wassergehalt mit 6 % festgelegt.

Sprüh- und Walzenmethode unterscheiden sich grundlegend in der Höhe und Dauer der Temperatureinwirkung sowie in der Abdampfgeschwindigkeit des Wassers. Beim Sprühverfahren bieten die kleineren Partikel mit der günstigeren Abdampfgelegenheit nach allen Seiten die Möglichkeit eines schnellen Wasserverlusts. Dadurch wird die eine Maillardreaktion begünstigende Feuchtigkeitstufe rasch durchlaufen. Die große Kühloberfläche der Milchkügelchen vermindert darüber hinaus eine Überhitzungsgefahr des Kondensats. Beim Walzenverfahren muß eine zusammenhängende Milchschiicht trocknen, die nur nach einer Seite Kühl- und Abdampfmöglichkeiten hat. Die gegenseitige Beziehung von Zeit, Temperatur und Konzentration bestimmt somit über das Calcium-Caseinat-System und dessen Veränderungen während der Trocknung die späteren Eigenschaften des Pulvers (134). Die bei Erhitzung stets beeinträchtigte Proteinlöslichkeit (79, 80, 85) wird bei Walzenpulver als brauchbares Beurteilungskriterium angesehen (40, 41, 128).

Somit ist das Problem einer Milchpulverherstellung, Milchkonservierung oder Lagerung von Milchprodukten eng mit den Voraussetzungen für die Maillardreaktion verknüpft. Eine leichte Erhitzung der Milch verbessert durch Inaktivierung eines Antitrypsinfaktors und Auffaltung der Peptidketten die Verdaulichkeit und biologische Wertigkeit des Proteins (78, 92, 128). Bei stärkerer Erhitzung sind Farbveränderungen, Verluste an essentiellen Aminosäuren sowie Veränderungen am Calcium-Caseinat-System zu verzeichnen. Diese Umgestaltungen können den Wert der Produkte erheblich beeinträchtigen (46, 63, 134). Allerdings wird eine hochgradige Proteinschädigung im Rahmen einer sorgfältigen Milchpulverherstellung nur selten auftreten.

Bei Erhitzung von Milch ergeben sich wegen des hohen Wassergehaltes weniger ausgeprägte Qualitätsverluste als bei der Trocknung zum Milchpulver (79, 92, 127). Dies ist vor allem für die zur Konservierung der Frischmilch notwendige Erhitzung (Pasteurisieren, Sterilisieren) wichtig. HODSON und KRUEGER sowie MAURON und Mitarbeiter u. a. fanden unter den durch Erhitzung der Milchproteine betroffenen essentiellen Aminosäuren immer Lysin als am stärksten beeinträchtigt (63, 70, 92, 93, 94). Ihrer Meinung nach ist dies ernährungsphysiologisch unbedeutend, solange das Produkt als einzige Proteinquelle dient. MAURON und Mitarbeiter (92, 93, 94) stellten an Hand ihrer umfangreichen Versuche eine Regressionsgleichung auf, die es ihnen gestattet, vom Anteil der festgestellten Lysinzerstörung (Ionenaustauschchromatographie) auf den der Inaktivierung zu schließen. Nach ihrer Ansicht sowie nach Empfehlungen anderer Autoren stellt der Gehalt an verfügbarem Lysin einen brauchbaren Indikator für stattgehabte Verarbeitungseinflüsse an Milchprodukten dar (40, 41,

102). PION (110) fand, daß die Bestimmung von DNFB-verfügbarem Lysin keine über die Ionenaustauschchromatographie hinausgehende Information erbringt. Allerdings ist die Lysinbestimmung mittels der Ionenaustauschchromatographie wesentlich schwieriger.

Die gleichzeitig auftretende Cystinzerstörung ist besonders bedeutsam, da im Milchprotein die schwefelhaltigen Aminosäuren für den Bedarf der monogastrischen Nutztiere nur knapp ausreichen. Bei Milchproteinen, die zu einer pflanzlichen Grundration als Ergänzungsprotein eingesetzt werden, ist der Gehalt an Lysin wertbestimmend (40, 70, 92, 93).

Bei der Lagerung von Trockenmilch treten Veränderungen am Fett, an Kohlenhydraten und am Protein ein. Meist gehen Protein und Milchzucker eine Maillardreaktion ein, die auch bei niedrigen Temperaturen nicht stagniert. Dies trifft vor allem bei einem hohen Wassergehalt der gelagerten Proben (über 3 %) zu. Die ersten Kondensationsprodukte erhöhen durch ihre hygroskopische Wirkung den Wasseranteil und steigern darüber hinaus die Reaktionsgeschwindigkeit durch eine Verschiebung des pH-Wertes (51, 129). Gleichzeitig nehmen die biologische Wertigkeit, die N-Verdaulichkeit und der Gehalt an Lysin, Arginin, Histidin und Methionin sowie an Laktose ab. Nach überlanger Lagerung werden Milchpulver braun und klumpig. Noch ungünstigeren Einflüssen unterliegen ungenügend verpackte oder feucht-warm gelagerte Produkte (9, 117). So steigert eine Temperaturerhöhung um 10°C die Reaktionsgeschwindigkeit auf das Vierfache (61).

Daraus ergibt sich, daß bei der Lagerung und Herstellung von Milchpulvern immer mehr oder weniger mit Proteinschädigung zu rechnen ist (9, 40, 117).

34. Eiweißkonzentrate

Die Rechtsgrundlage für den Handel mit Mischfuttermitteln bildet, außer dem Futtermittelgesetz und seinen Ausführungsverordnungen, die "Futtermittelanordnung in der Neufassung vom 24. 10. 1951". Daneben wurden von der Deutschen Landwirtschaftsgesellschaft sogenannte "Qualitätsrichtlinien" herausgegeben. In der "Normentafel für Mischfuttermittel" (Futtermittelanordnung) werden für Eiweißkonzentrate ein Mindestgehalt an Rohprotein von 45 % sowie ein Fischmehlanteil von 30 % und ein Gehalt von wenigstens weiteren 20 % Fischmehl oder sonstigen tierischen Eiweißfuttermitteln gefordert.

Der Futterwert von Eiweißkonzentraten ist von der Proteinqualität der verwendeten Eiweißfuttermittel abhängig. Neben den bereits genannten Fischmehlen und Tierkörpermehlen spielt hierfür Sojaschrot eine wichtige Rolle. Nach den genannten Verordnungen dürfen bis zu 50 % Sojaextraktionsschrot oder andere "Ölkuchen der Gruppe A" (das sind Rückstände von Sesam, Erdnuß oder Sonnenblumen) vermischt werden.

Bei einer chemischen Analyse von Sojaschrot fallen der für pflanzliche Futtermittel hohe Rohproteinanteil (45 %) und Lysingehalt (2,8 - 3,2 %) auf. In früheren Jahren überraschte die Diskrepanz zwischen dem zu erwartenden und dem tatsächlich erreichten Futterwert von rohem Sojaschrot. Dafür wird heute ein sogenannter "Antitrypsinfaktor" (und andere wachstumsdepressive Faktoren, z. B. das sogenannte Sojin) verantwortlich gemacht. Durch mäßige Dampferhitzung (Toasten) kann der Trypsininhibitor zerstört werden. Dies verbessert die Verdaulichkeit von Sojaprotein erheblich. Eine Proteinschädigung der Sojaschrote findet bei sorgfältiger Herstellung nicht statt.

C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Aufgabenstellung

Ein Analysenverfahren wird vor allem durch folgende Angaben charakterisiert:

1. Beschreibung des Analysenverfahrens (Technik, Eichgrundlagen, Störsubstanzen)
2. Beleganalysen und deren statistische Auswertung (Reproduzierbarkeit)
3. Erprobung der Methode im Routinebetrieb.

Trotz vorangegangener zahlreicher Untersuchungen anderer Autoren waren noch folgende Probleme zu überprüfen: Untersuchung der Bedingungen beim Ablauf der DNFB-Protein-Reaktion; Einfluß von DNFB auf den Fortgang der Analyse; Untersuchung der Bedingungen einer salzsauren Hydrolyse; Feststellung von Hydrolysenverlusten an DNP-Lysin bei verschiedenem Untersuchungsgut; Untersuchungen über Anwendungsmöglichkeiten der Methode auf kohlenhydratreiches Material.

Methodik

Benötigte Reagenzien und Geräte

1. Dinitrofluorbenzol (DNFB)

1-fluor-2, 4-dinitrobenzol. Erhältlich über die Firma Merck, Darmstadt. Beim Umgang mit DNFB ist die Verwendung von Saugpipetten und von Gummihandschuhen anzuraten.

2. Chlorkohlensäuremethylester

(Chlorameisensäuremethylester, Methoxycarbonylchlorid, Methylchloroformiat). Zu erhalten über die Firma Dr. Schuchardt, München. Das Reagenz ist stark schleimhautreizend.

3. Diäthyläther peroxydfrei

Käuflicher Diäthyläther DAB 6 wird mindestens 8 Tage über einem Gemisch aus gleichen Teilen 5%iger wässriger Kalilauge und 10%iger wässriger Ferrosulfatlösung aufbewahrt. Das Gemisch soll etwa zu 10 % dem Äther zugesetzt werden. Der so peroxydfrei gemachte Äther wird vor Gebrauch dreimal mit dem gleichen Volumen Wasser ausgeschüttelt und anschließend über KOH-Plätzchen destilliert. Vor- und Nachlauf (jeweils 5 %) werden ausgeschieden. Dieses Ätherdestillat ist nur 24 Stunden in

dunklen Flaschen peroxydfrei zu halten. Es sollte daher stets frisch bereitet werden.

4. Salzsäure, schwermetalldfrei; konzentriert; 7,75 n; 1 n
5. Methanol reinst
6. Natronlauge 2 n
7. Natriumbicarbonat, 8%ige (g/ml) wäßrige Lösung
8. Puffer pH 8,5 $\pm$ 0,2
 19 Teile einer 8%igen wäßrigen Lösung von NaHCO_3 + 1 Teil einer 8%igen wäßrigen Lösung von Na_2CO_3 . Der Puffer wird mit Salzsäure oder Natronlauge eingestellt (pH-Meter oder Spezial-Indikatorpapier). Auch im Kühlschrank soll der Puffer nicht länger als 10 Tage gelagert werden, da der pH-Wert später zu alkalisch geworden ist (nach 10 Tagen: pH 8,8 - 9,0).

- I. Rundstehkolben 100 ml mit Schliff NS 29
- II. Rückflußkühler 30 cm lang, Kugelkühler unten mit Schliff NS 29.
- III. Pipetten (Vollpipetten) 2 ml; 30 ml
- IV. Fortuna Saugpipetten, 0,1 ml (geht auch 1 ml), 5 ml, 10 ml
- V. Reagenzgläser mit Schliff NS 14, 5 und einer Marke bei 10 ml (günstig ist eine lange Form mit mindestens 20 ml Inhalt)
- VI. Papierfilter Schleicher und Schüll Weißband Nr. 589² oder ähnliche Filter
- VII. Eine Schüttelapparatur, die abgedunkelt werden kann (durch ein Tuch, oder durch entsprechende Säckchen über jedem Rundkolben)
- VIII. Photometer
- IX. pH-Meter

Arbeitsvorschrift

Sämtliche Analysen werden in Doppelbestimmungen ausgeführt. Die Einwirkung direkter Sonneneinstrahlung ist zu vermeiden.

1. 250 mg + 10 mg des analysenfein gemahlten lufttrockenen ^{†)} Untersuchungsgutes werden in einen Rundstehkolben (100 ml) genau eingewogen. Es werden 8 ml wäßrige Natriumbicarbonatlösung und einige Glasperlen zugegeben und das Untersuchungsgut suspendiert. Nach etwa 10 Min. fügt man 0,3 ml Dinitrofluorbenzol, gelöst in 12 ml Methanol, zu. Die Kolben werden verschlossen und zwei Stunden leicht geschüttelt.
2. Das Methanol wird durch Stellen der Kolben in ein kochendes Wasserbad abgedampft (um ein Übersäumen zu verhindern, kann man einen Tropfen Antischaumemulsion zugeben). Sobald das Methanol entfernt ist (die Flüssigkeit im Kolben siedet nicht mehr), fügt man 30 ml 7,75 n Salzsäure zu und hydrolysiert 17 Stunden bei Siedetemperatur am Rückflußkühler.
3. Nach der Hydrolyse wird das Kondensat aus den Kühlern mit Wasser zurückgewaschen, das Hydrolysat damit auf etwa 80 ml verdünnt und 1-2 Stunden in einem Eisbad gekühlt. (In den Rückflußkühlern bildet sich ein weißlicher kristalliner Belag, der in alkalischer Lösung gelb wird. Dies sind in saurer Lösung farblose Zerfallsprodukte des DNFB. Sie brauchen nicht berücksichtigt zu werden. Bei Anwesenheit größerer Mengen an Kohlenhydraten bildet sich ein brauner bis schwarzer Belag). Anschließend wird das Hydrolysat durch ein Weißbandfilter filtriert und mit Wasser ad 250 ml aufgefüllt. Das Hydrolysat muß meist noch weiter verdünnt werden (25 oder 50 ml ad 100), um die Extinktionen im Bereich der größten Genauigkeit des Photometers zu bekommen.
4. Von dem verdünnten Hydrolysat werden drei Proben entnommen (je 2 ml) und davon zwei in je ein Reagenzglas (Reagenzglas A und B) mit Schliff, die dritte Probe in einen Erlenmeyerkolben überführt. Diese dritte Probe wird mit 2 n Natronlauge gegen Phenolphthalein bis zum Umschlagpunkt titriert (es genügt ein Zählen der Tropfen) und dann verworfen.

^{†)} Wird eine Trocknung des Materials notwendig, so sollte, um Lysinverluste zu vermeiden, lediglich Gefriertrocknung angewandt werden. Es empfiehlt sich gleichzeitig mit der Bestimmung des verfügbaren Lysins eine Rohprotein- oder Wasseranalyse durchzuführen, um Fehler durch Schwankungen im Wassergehalt des Untersuchungsmaterials auszuschalten.

Die zur Neutralisation benötigte Menge Natronlauge gibt man der Probe im Reagenzglas B zu. Anschließend werden 2 ml des Puffers pH 8,5 (Bicarbonatpuffer) hinzugefügt. Dies bringt den Inhalt in einen pH-Bereich von 8,2 - 9,5 (selbst bei einem Irrtum von 1-2 Tropfen NaOH. Hier muß ohne Pause fortgefahren werden, da das DNP-Lysin in diesem pH-Bereich weniger stabil ist). Dann werden 0,05 (0,045 - 0,055) ml Chlorkohlensäuremethylester zupipettiert und kräftig umgeschüttelt. Nach einer Pause von 5 - 10 Minuten wird die Probe B vorsichtig, um ein Übersäumen zu verhindern, mit 0,75 ml konz. Salzsäure angesäuert.

5. Sowohl Probe A als auch Probe B werden mehrmals mit 5 ml peroxydfreiem Diäthyläther ausgeschüttelt und die Ätherschicht jedesmal mit einer Saugpipette entfernt. Den Restäther dampft man in einem warmen Wasserbad ab. Nach dem Abkühlen werden die Lösung im Reagenzglas A mit 1 n Salzsäure und die Lösung im Reagenzglas B (Blindprobe) mit Wasser bis zur Marke (10 ml) aufgefüllt und umgeschüttelt.
6. Die Probe A wird im Photometer bei einer Wellenlänge von 360 - 366 m μ in Glasküvetten mit einer Schichtdicke von 10 mm gegen die Probe B als Blindwert gemessen.

Standardsubstanz

Als Standard empfiehlt sich ϵ -DNP-Lysinhydrochlorid. [†]) Im Gegensatz zum ϵ -DNP-Lysin ist das Hydrochlorid leicht in 0,2 n - 1 n Salzsäure löslich. Das Molekulargewicht beträgt 366,7. Eine 50 Mikrogramm Lysin entsprechende Menge in 2 ml 1 n Salzsäure ergibt bei Behandlung nach der Analysenvorschrift ab Absatz 4 eine Extinktion von 0,57 (bei einer Wellenlänge 366 m μ , Schichtdicke der Küvette 10 mm).

$$E \frac{1\%}{1\text{ cm}} \quad 366\text{ m}\mu = 1140 \text{ (bezogen auf Lysin)}$$

[†]) Eine Standardsubstanz guter Qualität wird von der Firma Mann Research New York 6 N. Y. 136 Liberty Street geliefert. (Generalvertreter für die Bundesrepublik, Werner Gellert, Göttingen, Rastenburg, Weg 4 b)

Rechenbeispiel

Einwaage des Untersuchungsgutes 250 mg. Verdünnung ad 250 ml;
25 ml ad 100 ml; 2 ml ad 10 ml.

Die Extinktion sei 0,25.

Dies entspricht 22 Mikrogramm Lysin in 10 ml (2 ml)

oder 1100 Mikrogramm in 100 ml (in 25 ml)

oder 11 mg in 250 ml (in 250 mg)

oder 4,4 mg in 100 mg Untersuchungsgut,

oder 4,4 ‰

Ergebnisse und Diskussion

1. Untersuchungen zur Methode
11. Untersuchungen zum Problem der DNFB-Protein-Reaktion

Unter den vorliegenden Verhältnissen waren die für DNFB-verfügbares Lysin ermittelten Werte bei einstündigem Schütteln des Reaktionsgemisches deutlich niedriger als bei einer zweistündigen Einwirkung. Inwieweit sich die Dauer durch eine Erhöhung der Reaktionstemperatur, über die Zimmertemperatur hinaus, wirksam verkürzen ließe, wurde nicht nachgeprüft.

Sowohl eine Lichteinwirkung als auch eine DNFB-Protein-Reaktion ohne jede mechanische Bewegung des Reaktionsgemisches erbrachten niedrigere Werte für DNFB-verfügbares Lysin. Unter Umständen mag es genügen, das Reaktionsgemisch nur von Zeit zu Zeit von Hand aufzuschütteln. Jedoch ist im angewandten Zeitraum von zwei Stunden von einem bewegungslosen Stehenlassen der Proben abzuraten.

Die umfangreichsten Untersuchungen, vor allem in Hinblick auf den erwähnten positiven Einfluß eines DNFB-Überschusses auf die Anwendbarkeit der Methode bei kohlenhydratreichem Material (57, 116), wurden zur Frage der optimalen DNFB-Menge durchgeführt. Bei allen zu diesem Fragenkomplex unternommenen Untersuchungen zeigte es sich, daß größere Mengen als 0,3 ml Dinitrofluorbenzol in allen Fällen schlechtere Ergebnisse erbrachten. Dies um so mehr, je weniger Kohlenhydrate in dem Material vorhanden waren (hoher Gehalt an Rohprotein). Bei den Hydrolysaten fiel eine intensivere Gelbfärbung als normal auf. Die Hydrolysenkölbchen enthielten nach der Hydrolyse klebrige Rückstände. Während der Extraktion mit Äther war auch bei den Hauptproben eine starke Gelbfärbung des Äthers zu bemerken. Dies machte mehrmalige Extraktionen notwendig. Die intensive Farbe mag durch die vermehrt vorhandenen DNFB-Abbauprodukte (Dinitrophenol und Dinitroanilin) bedingt sein. Die DNFB-Abbauprodukte wurden durch die Ätherextraktion entfernt; außerdem zeigen sie im sauren pH-Bereich bei 360 m μ keine Extinktion. Vermutlich wirkt sich der Einfluß eines Dinitrofluorbenzolüberschusses hauptsächlich während der DNFB-Protein-Reaktion und der nachfolgenden Hydrolyse auf das Analysenergebnis aus.

Die Untersuchungen über die gegenseitige Beeinflussung von Dinitrofluorbenzol und Kohlenhydraten bestätigten die Befunde von HANDWERCK (57) und RAPP (116) über den schützenden Einfluß eines DNFB-Überschusses bei kohlenhydratreichen Proben. Die Verluste an reinem ϵ -DNP-Lysin bei der Hydro-

lyse zusammen mit Glukose (250 mg) nahmen zwar mit steigender DNFB-Menge ab, blieben aber absolut immer noch sehr hoch (50 %). Das kann an dem ungünstigen Mengenverhältnis von Glukose zu DNP-Lysin liegen (3-5 mg Lysin in Form des Standards standen 250 mg Glukose gegenüber). Ein derartig ungünstiges Verhältnis wird in nativen Proben kaum erreicht.

Bei der Verwendung hoher Mengen an Dinitrofluorbenzol im Rahmen routinemäßiger Analysen schwankten die Extinktionswerte normaler Proben bei den Doppelbestimmungen stärker als gewöhnlich, allerdings selten über 50% des höheren Wertes. Die für DNFB-verfügbares Lysin ermittelten Gehaltszahlen nahmen bei einer Verwendung von mehr als 0,3 ml Dinitrofluorbenzol mit steigender DNFB-Menge ab. Dies widerspricht dem Ergebnis aus Versuchen mit Zugabe von DNP-Standard (siehe oben). Bei verminderter DNFB-Menge (0,2 ml) ergaben sich, außer bei Milchpulver, immer geringere Extinktionswerte. Zu beachten ist, daß ein beträchtlicher Überschuß an Dinitrofluorbenzol schon bei der Verwendung von 0,3 ml DNFB vorhanden ist.

Anschließend wurde die Beziehung zwischen DNFB-Menge und Konzentration der Salzsäure untersucht. Die ermittelten Werte für DNFB-verfügbares Lysin änderten sich mehr in Abhängigkeit von der Salzsäurekonzentration als von der verwendeten DNFB-Menge (siehe Tabelle 1).

Die wiederholt empfohlene Entfernung von überschüssigem Dinitrofluorbenzol vor der Hydrolyse (22, 126, 132) kann also in kohlenhydratreichen Futtermitteln nur bei gleichzeitiger Entfernung vorhandener Kohlenhydrate sinnvoll sein.

Tabelle 1: Die Beeinflussung des Gehalts an DNFB-verfügbarem Lysin (Milchpulver) durch verschiedene Mengen an Dinitrofluorbenzol bei unterschiedlich konzentrierter Salzsäure. (Hydrolysendauer: 16 Stunden. Die angegebenen Gehaltszahlen (g/10gN) sind Mittelwerte von 2-4 Doppelbestimmungen).

SALZ- SÄURE ml DNFB	6,6 n 80 ml	7,06 n 50 ml	7,7 n 30 ml	7,7 n 50 ml	8,1 n 25 ml	8,1 n 30 ml	MITTEL- WERT
1,2				5,67			(5,67)
0,6	5,81		6,32	5,85	6,17	6,24	6,15
0,3		6,30	6,30 ⁺	6,06	6,10	6,32	6,15
0,2			6,34	5,90	6,27	6,19	6,18
MITTEL- WERT	(5,81)	(6,30)	6,32	5,87	6,18	6,25	

⁺) Konzentrationsbereich von Dinitrofluorbenzol und Salzsäure bei der Bestimmung des verfügbaren Lysins.

12. Untersuchungen zur Hydrolyse

Nach eigenen Untersuchungen und Angaben anderer Autoren beeinträchtigen Einwaagemengen von weniger als 200 mg eines Futtermittels die Reproduzierbarkeit der Analysenergebnisse (22, 48, 102). RIESEN und Mitarbeiter (119) berichten, daß eine 3-normale Salzsäure die gleiche Menge an DNP-Lysin freisetzen vermöge wie eine 6-normale. Eine weitere Zunahme der Konzentration erhöhe jedoch die Verluste für DNP-Lysin stark. Bei Verwendung 6-normaler Salzsäure fanden JUSTISZ und PENASSE (69) das Maximum für die Freisetzung von ϵ -DNP-Lysin nach einer Hydrolysendauer von 13 bis 16 Stunden.

Die Versuche wurden vergleichend an verschiedenen Proben Fischmehle und Magermilchpulver für folgende Mengen an Salzsäure durchgeführt:

80 ml --- 6,6 n Salzsäure	30 ml --- 7,75 n Salzsäure
50 ml --- 7,06 n Salzsäure	25 ml --- 8,1 n Salzsäure

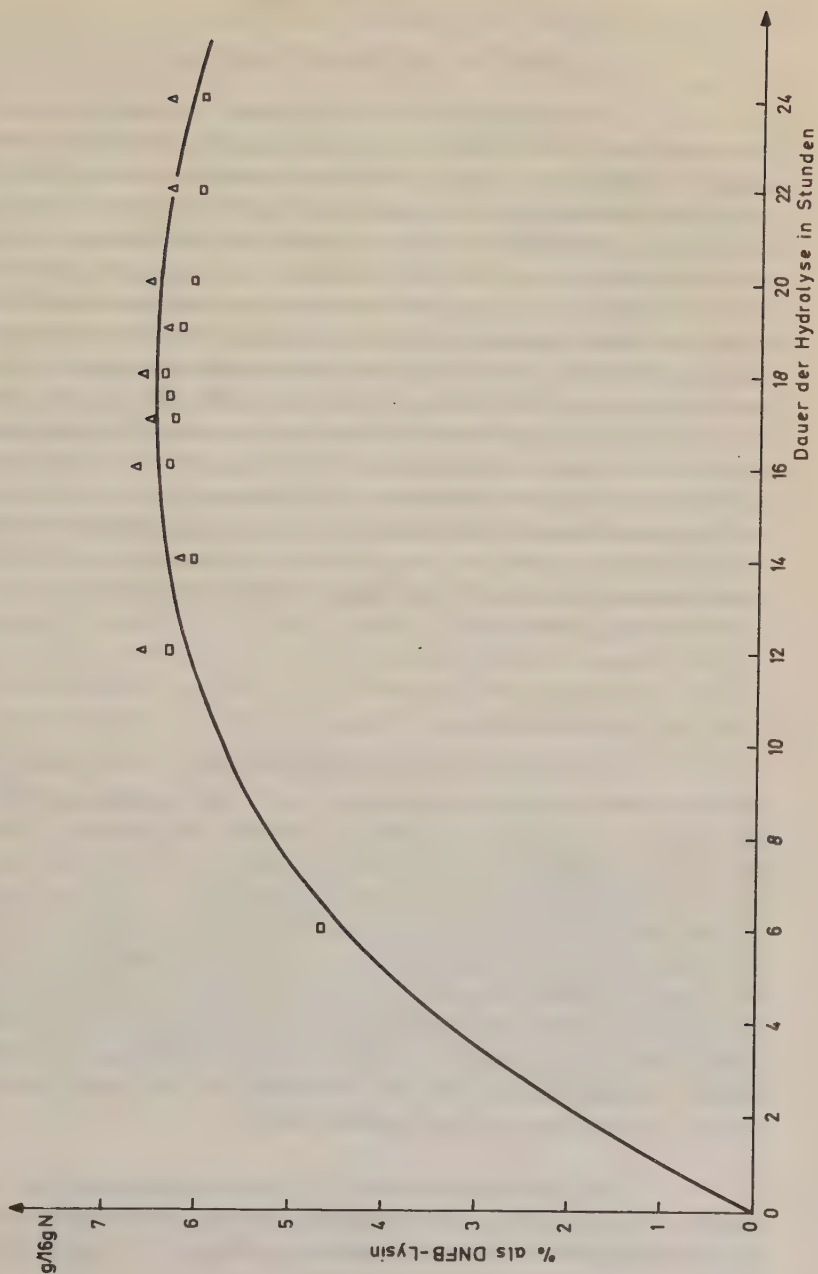
Dabei sind Konzentration und Menge der Salzsäure so berechnet, daß das Hydrolysat nach der Zugabe von 8 ml 8%iger Natriumhydrogencarbonatlösung der Konzentration einer 6,1-normalen Salzsäure entspricht. Es änderte sich somit nur die Gesamtmenge an Salzsäure. Die Dauer der Hydrolyse wurde im Intervall von 12 bis 24 Stunden mit ein- bzw. zweistündigem Abstand verändert.

Die für Fischmehl und Milchpulver ermittelten Hydrolysenkurven (bei Verwendung von 30 ml 7,75-normaler Salzsäure) zeigen einen für die Freisetzung von DNP-Lysin aus beiden Materialgruppen grundsätzlich gleichen Verlauf (siehe Abbildung 2). Die von verschiedenen Autoren erwähnte unterschiedliche Freisetzung von Aminosäuren aus verschiedenem Untersuchungsmaterial war im vorliegenden Fall für das Lysin nicht nachweisbar (69, 84, 131).

Die Verwendung einer größeren Salzsäuremenge bewirkte vor allem eine verminderte Bildung dunkelgefärbter Substanzen während der Hydrolyse. Dies stimmt mit der Beobachtung von verschiedenen Autoren (z. B. 73, 102, 119) überein, die eine Unterdrückung der Kohlenhydrathuminbildung bei einem weiten Salzsäure-Substrat-Verhältnis gefunden hatten. Die Gehaltswerte an verfügbarem Lysin und die Extinktionswerte der Blindprobe wurden dagegen wenig beeinflusst. Die an Hand verschiedener Konzentrationen von Salzsäure ermittelten Werte für DNFB-verfügbares Lysin lassen vermuten, daß bei Verwendung von 80 ml 6,6 n Salzsäure nicht genügend hohe Gehaltswerte für verfügbares Lysin erhalten werden. Diese Ansicht wird durch die Versuche über Hydrolysenverluste an DNP-Lysin bei verschiedenen Salzsäurekonzentrationen bestätigt (siehe auch Tabelle 1). Die höchsten Werte für DNFB-verfügbares Lysin in Magermilchpulver und der ausgeglichenste Hydrolysenverlauf ließen sich bei der Verwendung von 30 ml 7,75 n HCl erbringen. Bei Fischmehl ergaben sich ähnliche, doch weniger eindeutige Ergebnisse. Die an Milchpulver und Fischmehl ermittelten Befunde wurden in einigen Fällen durch Untersuchungen an Testgemischen aus Glukose und Casein überprüft. Dabei deutete sich für die kohlenhydratreicheren Mischungen ein Optimum für die Ausbeute an DNP-Lysin bei Verwendung von 50 ml 7,06 n Salzsäure an.

Durch Verlängerung der Hydrolysendauer auf 17 Stunden konnten für Milchpulver und kohlenhydratreiche Proben höhere Werte an verfügbarem Lysin ermittelt werden. Undeutlicher war diese Verbesserung bei Fischmehlen und anderen proteinreichen Proben. Längere Hydrolysenzeiten zeigten einen negativen Einfluß (siehe Abbildung 2).

Hydrolytische Freisetzung von DNFB-Lysin aus Fischmehl Δ und Magermilchpulver $\square$ (Verwendung von 30 ml 7,75 n Salzsäure)



13. Untersuchungen zur Analysetechnik

131. Lichteinfluß und Möglichkeiten einer Lagerung von Hydrolysaten

Übereinstimmend wird in der Literatur von der Lichtempfindlichkeit sowohl der DNFB-Protein-Reaktion als auch der entstandenen DNP-Verbindungen berichtet (22, 48, u. a.). Wie bereits erwähnt, konnte eine deutlich negative Beeinflussung der Reaktionsablaufes durch Lichteinwirkung gefunden werden. Nicht so eindeutige Verhältnisse ergaben sich bei Lagerung von Hydrolysaten. Die Extinktionswerte ätherextrahierter Proben änderten sich innerhalb von 48 Stunden, unbeeinflusst von einem Lichteinfluß (elektrische Lichtquelle), nicht. Erst später zeigten die dem Licht ausgesetzten Proben deutlich geringere Extinktionswerte. Bei der Lagerung unbehandelter Hydrolysate (Endverdünnung) fand sich auch bei ständiger Belichtung selbst nach einigen Wochen keine Beeinflussung der Farbintensität. Der Extinktionsabfall von ätherextrahierten Proben dürfte somit auf die schädliche Einwirkung von Peroxyden aus den in der Probe verbleibenden Ätherresten zurückzuführen sein. Die im Hydrolysat vorhandenen Abbauprodukte von Dinitrofluorbenzol oder Kohlenhydraten üben keinen negativen Einfluß aus. Damit finden sich Angaben von SANGER und anderen Autoren (z. B. 48, 122) bestätigt, daß DNP-Aminosäuren im niedrigen pH-Bereich gut haltbar sind.

132. Extinktionsbereich

Trotz zahlreicher Literaturangaben über die Wahl des optimalen Extinktionsbereiches für die Bestimmung von DNFB-verfügbarem Lysin, wurden einige weitere Versuche unternommen. Manche Untersucher (49, 109) betonen die Absorptionsefähigkeit der bei einer Kohlenhydrat-Protein-Reaktion entstehenden Verbindungen im ultravioletten Spektralbereich. An Hand einer vergleichenden Extinktionsmessung bei den Wellenlängen 436 m μ und 366 m μ wurde untersucht, ob diese gefärbten Substanzen innerhalb des in der Methodik gewählten Meßbereiches von 366 m μ eine größere Störquelle bilden als in dem von CARPENTER und Mitarbeiter (22) vorgeschlagenen Wellenbereich, ERBERSDOBLER (37) berichtet in diesem Zusammenhang von einer Überlagerung des Absorptionsmaximum von DNP-Lysin durch ein neues Absorptionsmaximum von Produkten aus der Maillardreaktion.

Wie Untersuchungen an 30 Proben kohlenhydratreichen Materials ergaben, lag der Anteil, den der Blindwert an der Gesamttextinktion einnahm, bei kohlenhydratreichen Proben wesentlich höher (16 - 18 %) als bei Eiweiß-

futtermitteln (9-12 %). Vergleichende Extinktionsbestimmungen ergaben einen deutlich höheren Anteil dieses Extinktionswerts (der Blindproben) an der Gesamttextinktion bei 435 m μ (durchschnittlich 16,8 % statt 13,4 % bei 366 m μ). Wahrscheinlich wirken sich Störeinflüsse im Absorptionsmaximum des DNP-Lysins (360 m μ) geringer aus als bei $\lambda = 436$ m μ (37). Ein Vergleich der an zwölf Kohlenhydrat-Protein-Gemischen sowohl bei der Wellenlänge von 436 m μ als auch bei $\lambda = 366$ m μ ermittelten Werte für verfügbares Lysin zeigt aus diesen Gründen bei Messung im Extinktionsbereich von 436 m μ um durchschnittlich 4,6 % niedrigere Ergebnisse. Das Verhältnis der Gehaltszahlen bei den Proben bleibt jedoch voll erhalten. Damit steht das Ergebnis in gewissem Widerspruch zu Angaben anderer Autoren (37, 110), die keinen Unterschied zwischen der Messung bei 360 m μ und bei 435 m μ finden konnten. Allerdings enthielt das Untersuchungsmaterial bei den vorliegenden Versuchen einen hohen Kohlenhydratanteil.

133. Reproduzierbarkeit: Wiederholungs- und Vergleichsstreuung

Die sehr gute Reproduzierbarkeit der Dinitrofluorbenzolmethode wird wiederholt betont (z. B. 22, 37). Eigene Untersuchungen an Milchkpulver und Fischmehl, über einen Zeitraum von 2 Jahren verteilt, konnten diese Feststellung durchaus bestätigen. Bei Milchkpulver war eine etwas stärkere Streuung der Analysenergebnisse vorhanden (Variabilität 2,03 %) als bei Fischmehlen (1,72 %). Beide Wiederholungsstreuungen unterscheiden sich nicht signifikant für $P 0,05$.

Unregelmäßig verteilte Vergleichsuntersuchungen mit anderen Untersuchern am gleichen Institut ergaben an willkürlich ausgewählten Proben im WILCOXON-Test keinen signifikanten ($P 1\%$) Unterschied zwischen den Ergebnissen. Eine Vergleichsstreuung fällt in den meisten Fällen größer aus als die Reproduzierbarkeit durch ein und dieselbe Person. Doch beweist die errechnete Annahmemöglichkeit der Ho-Hypothese bei $\alpha = 0,1$ im Rangsummentest, daß eine gute Reproduzierbarkeit der Analysenergebnisse bei der Dinitrofluorbenzolmethode auch durch verschiedene Untersucher möglich ist.

2. Untersuchungen an Testgemischen aus kohlenhydrat- und lysinreichen Komponenten

Über die Bestimmungsmöglichkeit von verfügbarem Lysin nach der Dinitrofluorbenzolmethode bei Materialien pflanzlichen Ursprungs oder kohlenhydratreichen Futtermischungen bestehen unterschiedliche Angaben. Trotz des von HANDWERCK und Mitarbeiter (57) und anderen Autoren (18, 114) gefundenen Schutzeffektes durch einen DNFB-Überschuß wird von Hydrolysenverlusten an frei zugefügtem DNP-Lysin in der Größenordnung von 30 bis 70 % berichtet (23, 57, 102). Dabei soll das Ausmaß der Verluste von der Art und Menge vorhandener Kohlenhydrate bestimmt werden (57). Die Ursache wird in der Reduktion der Nitrogruppen des Dinitrophenylrestes zu Aminogruppen gesehen, wodurch sich eine Abnahme der zur Extinktion kommenden gelben Farbe ergeben soll. Bei Anwesenheit reduzierender Gruppen bilden sich diese Spaltprodukte in verstärktem Umfang (48). Im Gegensatz dazu berichtet CLEGG (29) von einer bedingten Anwendbarkeit des Verfahrens auf kohlenhydratreiches Material. Wie auch später CARPENTER und Mitarbeiter (23) konnte sie eine generelle Übereinstimmung ihrer Werte für DNFB-verfügbares Lysin mit Ergebnissen aus Fütterungsversuchen finden.

Für die experimentelle Überprüfung dieser Frage wurden insgesamt fünfzehn Modellmischungen untersucht. Sowohl in den Einzelkomponenten als auch in den Mischungen wurden der Gehalt an Rohprotein und DNFB-verfügbarem Lysin bestimmt. Dem in der Mischung gefundenen Gehalt wurde der aus den Gemenganteilen der Einzelkomponenten errechnete Sol¹-Wert gegenübergestellt. Aus der Abweichung beider Werte wurden Rückschlüsse auf die Beeinflussung der Analysengenauigkeit durch Verdünnung des Proteins mit kohlenhydratreichem Material möglich.

Während der Analysen fiel auf, daß Mischungen, die Glukose oder Maisstärke enthielten, sich rasch nach Hydrolysenbeginn dunkelbraun bis schwarz färbten. Eine leichte Karamelisierung war schon beim Abdampfen des Methanols zu bemerken. Nach beendeter Hydrolyse verblieb ein schwarz-kohliger, schlecht entfernbare Rückstand in Kolben und Kühler. Die Hydrolysate zeigten eine deutlich bräunliche Verfärbung. Die Extinktionswerte der Blindproben (gegen Aqua dest.) waren doppelt so hoch wie bei Fischmehlen. Hydrolysate ohne eine vorherige Zugabe von Dinitrofluorbenzol färbten sich zwar dunkelbraun, zeigten aber bei der Wellenlänge 366 m μ keine Extinktion.

Die erhaltenen Ergebnisse sind in den Tabellen Nr. 2 und Nr. 3 dargestellt. Der durchschnittliche Unterschied zwischen ermitteltem und erwart-

Tabelle 2: Untersuchungen an Testgemischen:

Gehaltswerte der Mischkomponenten an Protein und verfügbarem Lysin (g/16 g N)

	% Rohprotein	% verfüg. Lysin (g/16 g N)
Fischmehl 1	66,1	7,04
Fischmehl 2	63,7	6,03
Sojaschrot	47,8	5,34
Roggenfuttermehl	16,1	2,67
Casein 1	83,5	8,00
Casein 2	83,6	8,16
Glukose ⁺	----	0,07
Maisstärke ⁺	----	0,04

⁺) Diese Werte geben einen in Blindversuchen ermittelten scheinbaren Lysingehalt der Mischkomponenten an. Der scheinbare Lysingehalt wurde anteilmäßig für die Berechnung der Gehaltswerte an Lysin in den Mischungen herangezogen.

tem (= Soll) Gehalt an DNFB-verfügbarem Lysin liegt mit 7,3 % des Sollwertes erfreulich niedrig. Dies bestätigt die Erfahrung von CLEGG (29), die in Biskuits 2,63 g DNFB-verfügbares Lysin/16 g N statt eines Sollgehalts von 2,78 gefunden hatte. In Übereinstimmung mit den Angaben aus der Literatur (61; u. a.) waren die Hydrolysenverluste bei Glukose am höchsten. Die für Futtermittelanalysen interessanten Gemengteile, wie Roggenfuttermehl oder Sojaschrot, erhöhten die Verluste an DNP-Lysin-Standard während der Hydrolyse nur geringfügig. Möglicherweise sind, wenn die ersten DNP-Lysin-Moleküle aus dem Proteinverband freigesetzt werden, störende Abbauprodukte von Kohlenhydraten oder Dinitrofluorbenzol durch die Hydrolyse schon so weitgehend inaktiviert, daß die Lysinverluste nicht so hoch werden. Bei Zugabe von freiem DNP-Lysin zu den Testgemischen vor der Hydrolyse lagen die Verluste wesentlich höher als bei Zugabe nach Beginn der Hydrolyse (s. Tab. 4).

Tabelle 3: Untersuchungen an Testgemischen

Nr.	Mischung	% Roh- protein	% verfügbares Lysin (g/16gN)		Verlust an verf. Lysin (in %)
	Zusammensetzung %		errechnet	gefunden	
1	30 Fischmehl 1 70 Roggenfuttermehl	28,4	4,89	4,72	- 4
2	60 Fischmehl 1 40 Roggenfuttermehl	44,8	6,12	5,96	- 3
3	50 Fischmehl 1 50 Sojaschrot	55,6	6,13	5,91	- 4
4	30 Fischmehl 1 30 Sojaschrot 40 Roggenfuttermehl	40,4	5,57	5,37	- 4
5	30 Casein 1 70 Glukose	24,7	6,17	7,73	- 5
6	30 Casein 1 70 Maisstärke	25,3	8,09	7,15	-10
7	30 Casein 1 70 Fischmehl 2	69,6	6,74	6,70	- 1
8	50 Fischmehl 2 50 Glukose	29,8	6,16	5,68	- 8
9	50 Fischmehl 2 50 Maisstärke	30,8	6,10	5,58	- 8
10	50 Casein 2 45 Glukose 5 Mineralstoffe	42,1	8,23	7,41	-10
11	50 Casein 2 50 Glukose	41,8	8,25	7,37	-11
12	30 Casein 2 60 Glukose 10 Mineralstoffe	25,5	8,39	7,41	-11

Fortsetzung Tabelle 3

Nr.	Zusammensetzung %	% Roh-Protein	% verfügbares Lysin (g/16gN)		Verlust an verf. Lysin (in %)
			errechnet	gefunden	
13	30 Casein 2 70 Glukose	25,4	8,36	7,36	-12
14	70 Casein 2 30 Glukose	58,4	8,19	7,36	-10
15	70 Casein 2 20 Glukose 10 Mineralstoffe	58,4	8,18	7,48	- 9

Die Ergebnisse von Untersuchungen zum Gehalt an verfügbarem Lysin nach Lagerung der Testgemische sind in Tab. 5 und Abb. 3 zusammengefaßt. Der durchschnittliche, durch 2 1/2-jährige Lagerung bedingte Verlust an DNFB-verfügbarem Lysin lag bei 4,2 %. Für die einzelnen Mischbestandteile, und noch mehr für die Mischungen selbst, mußten Lagerungsverluste an verfügbarem Lysin durch Bräunungsreaktionen angenommen werden (40; 64; 117). Diese Erwartung konnte bei den Nachuntersuchungen sowohl für den Gehalt an Rohprotein als auch an DNFB-verfügbarem Lysin bestätigt werden. Im Rahmen dieser Nachuntersuchungen fanden wir einen Wassergehalt von durchschnittlich 8,16 % (7,24 - 9,88). In Anbetracht des hohen Wassergehalts und der Tatsache, daß die Proben bei Zimmertemperatur gelagert waren, müssen für die Verluste während der Lagerung Reaktionen vom "Maillard-Typ" verantwortlich gemacht werden. Daß kohlenhydratarme Mischungen (Nr. 3 und Nr. 7) keine nennenswerten Verluste erlitten hatten, unterstützt diese Annahme. Die ermittelten Gehaltsunterschiede für DNFB-verfügbares Lysin sind zwischen der ersten und der letzten Bestimmung im Rangsummentest nach WILCOXON für $\alpha = 0,01$ signifikant.

Tabelle 4:

Verluste an zugegebenem DNP-Lysin-Standard während der Hydrolyse in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Standardzugabe.

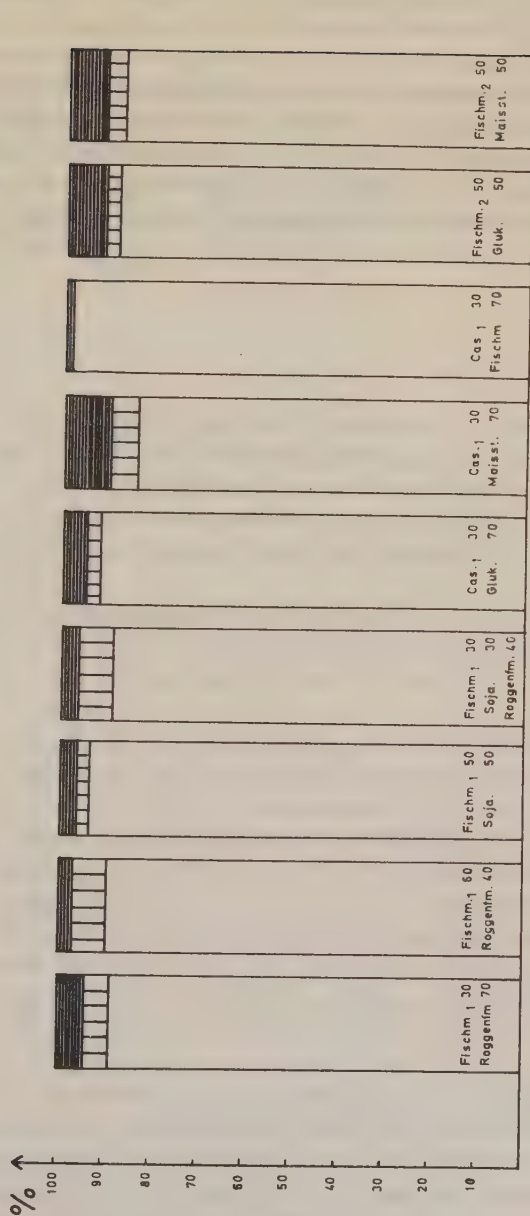
Probe	Anzahl der Doppelbestimmungen	Zeitpunkt der Standardzugabe	Durchschnittlicher Verlust in % des Sollwertes
Fischmehl	5	vor der Hydrolyse	5,7
	18	45 Min. nach Beginn der Hydrolyse	3,2
Milchpulver	2	vor der Hydrolyse	13,7
	7	45 Min. nach Beginn der Hydrolyse	7,1
Testgemisch 6 (Casein 30 + Maisstärke 70)	2	vor der Hydrolyse	17,9
	2	45 Min. } nach Beginn d.	14,0
	2	5 Std. } Hydrolyse	9,2
	2	nach Beendig. d. Hydrolyse	-

Tabelle 5: Verluste an verfügbarem Lysin während der Lagerung von Testgemischen

Nr.	Mischung Zusammen- setzung (%)	Zeitpunkt der Untersuchung nach:	% Roh- protein	% verfügbares Lysin (g/16 gN) errechnet	gefunden	Verlust an verf. Lysin (in %)
1	30 Fischmehl 1 70 Roggenfutter- mehl	12 Wochen 6 Monaten 12 Monaten 27 Monaten	28,4	4,89	4,80 4,45 4,41 4,36	- 2 - 9 -10 -11
2	60 Fischmehl 1 40 Roggenfutter- mehl	12 Wochen 6 Monaten 12 Monaten 27 Monaten	44,8	6,12	6,02 5,82 5,63 5,45	- 2 - 5 - 8 -11
3	50 Fischmehl 1 50 Sojaschrot	12 Wochen 6 Monaten 12 Monaten 27 Monaten	55,6	6,13	5,82 5,70 5,58 5,76	- 5 - 7 - 9 - 6
4	30 Fischmehl 1 30 Sojaschrot 40 Roggenfutter- mehl	12 Wochen 6 Monaten 12 Monaten 27 Monaten	40,4	5,57	5,07 5,02 4,63 4,96	- 9 -10 -17 -11

Nr.	Mischung Zusammen- setzung (%)	Zeitpunkt Untersuchung nach:	% Roh- protein	% verfügbares Lysin (g/16 gN) errechnet	gefunden	Verlust an verf. Lysin (in %)
5	30 Casein 1 70 Glukose	0 27 Monaten	24,7	8,17	7,73 7,21	- 5 - 8
6	30 Casein 1 70 Maisstärke	0 27 Monaten	25,3	8,09	7,15 6,96	-10 -14
7	30 Casein 1 70 Fischmehl 2	0 27 Monaten	69,6	6,74	6,70 6,70	- 1 - 1
8	50 Fischmehl 2 50 Glukose	0 27 Monaten	29,8	6,16	5,68 5,48	- 8 -11
9	50 Fischmehl 2 50 Maisstärke	0 27 Monaten	30,8	6,10	5,58 5,37	- 8 -12

Mindergehalte an verfügbarem Lysin (in Prozent des errechneten Vollwerts)
 bei verschiedenen Testgemischen  sowie Verluste nach einer Lagerung
 der Mischungen von 27 Monaten 



Zweierlei Überlegungen führten zu Versuchen über den Einfluß von Mineralstoffen auf die Analysengenauigkeit. Einmal Erfahrungen über die Entwicklung störender Nebenfarben bei Verwendung von Zinnchlorid aus anderen Versuchsreihen und weiterhin die Tatsache, daß in den zu untersuchenden Eiweißkonzentraten 5 bis 7 % einer Mineralstoffmischung enthalten waren. An Hand von sechs Testgemischen kann festgestellt werden, daß eine Beimengung von Mineralstoffen keine Auswirkung auf die Brauchbarkeit des Analysenverfahrens hat. (Siehe Tabelle Nr. 3, Proben-Nr. 10 - 15). Die Verlustrate scheint sogar bei den mineralstoffhaltigen Mischungen etwas geringer zu sein.

3. Der Gehalt an verfügbarem Lysin in verschiedenen Eiweißfuttermitteln

Ausgehend von der Forderung nach einer raschen Proteinbewertung wurden insgesamt 127 aus dem Handel gezogene Futtermittelproben auf ihren Gehalt an DNFB-verfügbarem Lysin untersucht. Gleichzeitig sollten diese Bestimmungen der statistischen und technischen Festigung der Methode dienen und eine genügend große Zahl an Vergleichswerten erbringen. Da es sich bei dem Gehalt an DNFB-verfügbarem Lysin um einen Relativwert handelt, wurde auf die Anwendung eines Korrekturfaktors zum Ausgleich von Hydrolysenverlusten bisher verzichtet.

31. Fischmehle

Mit DNP-Lysin-Standard durchgeführte Versuche zur Bestimmung der Hydrolysenverluste bei Fischmehl als Untersuchungsmaterial (16 Stunden Hydrolysendauer, 8,1 bzw. 7,75 n HCl) ergaben einen durchschnittlichen Verlust an Lysin von 3,9 %. Die Art des Fischmehls oder die Menge der Standardzugabe beeinflussten das Ausmaß der entstandenen Verluste nur unwesentlich.

Ergebnisse der Untersuchungen an Fischmehlproben sind in Tabelle Nr. 6 aufgeführt. Bei den Proben N. 1 - III handelt es sich nicht um eigentliche Fischmehle sondern um Fischlebermehle und Crayfischmehl.

Der Rohproteingehalt der Fischmehle betrug im Mittel 64,3 % (47,4 - 70,8 %). Er lag nur bei einer Probe (Nr. 1) unter dem in den erwähnten Richtlinien der deutschen Fischindustrie geforderten Mindestgehalt (z. B. Fischmehl: 55 %, Heringsmehl: 55 %, usw.). Diese Probe zeigte auch einen auffallend geringen Gehalt an DNFB-verfügbarem Lysin. Der Mittelwert für alle untersuchten Proben lag bei 5,94 % im Rohprotein (4,45 - 6,77 %). Werte anderer Autoren für Fischmehle liegen im Bereich von 3,8 - 8,8 %. Hierbei ist zu berücksichtigen, daß die meisten Untersuchungsergebnisse, als Ausgleich für Hydrolysenverluste, um 8 % nach der Empfehlung von CARPENTER u. Mitarb. (22) erhöht sind.

Die zwischen den Gehaltswerten an Rohprotein und DNFB-verfügbarem Lysin errechnete Korrelation ($r = 0,32$) ließ sich mit $3 \text{ mr} = 0,46$ statistisch nicht sichern. Diese schlechte Korrelation bestätigt die unzulängliche Beurteilungsmöglichkeit von Fischmehlen allein auf der Basis des Rohproteingehaltes. Bei manchen Proben ließ sich durch den mikroskopischen Nachweis von verkohlten Partikeln (- Überhitzung!) ein Hinweis auf ihren geringen Gehalt an verfügbarem Lysin feststellen.

Tabelle 6: Gehalt an Rohnährstoffen und verfügbarem Lysin (g/16gN) in 34 Proben Fischmehle
(Die Proben wurden nach steigendem Rohproteingehalt geordnet)

Nr.	Probe Herkunft	Roh- protein (Nx6, 25)	Roh- fett %	Roh- asche %	verfügb. Lysin (g/16gN)	Mikroskopischer Befund, Bemerkungen
I	Isl. Dorschleberm.	34, 4	47, 6	7, 1	3, 61	Dorschleberm., auffällig viel Diatomeen
II	Cray-Fischmehl	43, 5	7, 0	30, 2	4, 30	Besteht überwieg. aus Garnelen u. a. dünnsh. Krebs.
III	Dorschlebermehl	46, 8	22, 7	18, 5	4, 51	Leberbest. u. 40-50% Muskelfl. u. entleimt. Dorschkn.
1	Marokko-Fischmehl	47, 4	5, 6	31, 9	4, 45	Heringsart. Fische, erhebl. Salzgeh., viel Knochen
2	Fischmehl	58, 9	10, 5	-	5, 12	Keine näheren Angaben
3	Fischmehl	60, 3	1, 7	-	6, 64	"
4	Isl. Dorschmehl	61, 3	0, 8	28, 6	5, 53	Sehr knochenreich, viel Asche, Glycin u. Prolin
5	Angola-Fischm.	62, 4	7, 6	20, 3	6, 39	Beifangfrei, hauptsächlich Heringsartige
6	Peru-Fischmehl	62, 5	5, 9	15, 6	6, 03	Anchovisarten u. 5-10% Thunfisch-(Bonito-)Anteil
7	Isl. Dorschmehl	62, 7	1, 5	25, 8	5, 33	Sehr knochenreich, beifangarm
8	Isl. Dorschmehl	63, 6	3, 9	21, 0	4, 94	Viel Knochen u. Glycin, fast nur Fische d. Dorschfam.
9	Deutsch. Fischmehl	63, 7	-	-	6, 03	Vom Hersteller als mittlere Qualität bezeichnet
10	Peru-Fischmehl	63, 8	4, 7	14, 8	6, 10	Überwieg. Anchovisarten, 10 % Thunfisch
11	Fischmehl	64, 0	-	-	5, 81	Keine näheren Angaben
12	Fischmehl	64, 0	4, 9	-	5, 87	"
13	Peru-Fischmehl	64, 4	4, 0	14, 8	5, 43	Fast nur Anchovisarten
14	Peru-Fischmehl	64, 4	3, 6	15, 9	6, 04	Technisch reines Mehl, Heringsartige, beifangarm
15	Peru-Fischmehl	64, 4	4, 7	15, 3	6, 41	Anchovisarten, gute Reinheit, vereinz. angekohl. T.

Fortsetzung Tabelle 6

Nr.	Probe Herkunft	Roh- protein (Nx6, 25)	Roh- fett %	Roh- Asche %	verfügb. Lysin (g/16gN)	Mikroskopischer Befund, Bemerkungen
16	Peru-Fischmehl	64, 6	9, 6	17, 2	6, 15	Stabilisiert mit Butylhydroxytoluol (BHT)
17	Peru-Fischmehl	64, 9	3, 8	15, 4	4, 98	Anchovisarten, vereinz. angekohlte Teile, gute Reinh
18	Peru-Fischmehl	65, 1	10, 0	17, 2	6, 01	Stabilisiert mit Butylhydroxytoluol
19	Fischmehl	65, 3	3, 4	-	5, 05	1/4 d. Partikel mehr od. weniger verkohlt
20	Peru-Fischmehl	65, 3	10, 7	15, 6	6, 52	Stabilisiert mit Ethoxyquin
21	Peru-Fischmehl	65, 4	10, 8	15, 9	6, 56	Stabilisiert mit Ethoxyquin
22	Chile-Fischmehl	65, 8	5, 7	13, 7	6, 69	Fast nur Sardinen-Sardellenarten, Salzgehalt erh. ?
23	Deutsch. Fischmehl	66, 1	-	-	6, 69	Vom Hersteller als gute Qualität bezeichnet
24	Chile-Fischmehl	66, 4	4, 8	13, 6	6, 07	Fast nur Sardinen-Sardellenarten, erh. Salzgehalt ?
25	Peru-Fischmehl	67, 4	5, 6	13, 3	6, 45	Ausschließlich Anchovisarten
26	Fischmehl	67, 5	6, 3	-	6, 77	Keine näheren Angaben
27	Fischmehl	67, 6	2, 8	-	6, 30	"
28	Peru-Fischmehl	68, 0	6, 0	15, 2	6, 26	"
29	Fischmehl	68, 2	4, 0	-	5, 40	"
30	Peru-Fischmehl	68, 5	6, 6	15, 2	6, 45	"
31	Isl. Heringsmehl	70, 8	9, 2	10, 7	5, 62	Reines Heringsmehl

barem Lysin erbringen, so z. B. bei Nr. 1 oder Nr. 19. ^{†)}

Im allgemeinen waren Proben derselben Herkunft (z. B. "Peru-Fischmehl") recht einheitlich. Das erlaubt bei standardisiertem Angebot gewisse Schlüsse auf Zusammensetzung oder Qualität der Proben. Das ungünstige Abschneiden der Isländischen Dorschmehle dürfte vor allem auf das Rohmaterial zurückzuführen sein (viel Filetierabfall, reichlich Knochenanteil).

Der mittlere Rohfettgehalt lag bei 5,7 % (0,8 - 10,8 %). Ausgehend von der in der Literatur berichteten maßgeblichen Beteiligung der Fette an Lysinverlusten bei Lagerung wurde für 24 der Fischmehlproben die Korrelation zwischen dem Gehalt an Rohfett und an DNFB-verfügbarem Lysin geprüft. Die erwartete negative Beziehung ließ sich statistisch nicht absichern ($r = -0,17$ und $3\text{ mr} = 0,57$). Das spricht dafür, daß weniger der Fettgehalt sondern mehr die Qualität des Rohfetts für Verluste an verfügbarem Lysin verantwortlich ist. Übereinstimmend mit diesen Befunden ist die Mitteilung von PRITCHARD u. Mitarb. (113), die ebenfalls keine Korrelation zwischen den Gehalten an Rohprotein und Rohfett und dem Anteil an DNFB-verfügbarem Lysin finden konnten.

Der Aschegehalt hängt vor allem vom Ausgangsmaterial und dem Beifanganteil ab. Bei 21 untersuchten Proben lag der Mittelwert für den Rohaschegehalt bei 17,5 % (10,7 - 31,9 %). Ein hoher Aschegehalt und der Hinweis aus der mikroskopischen Untersuchung "viel Beifang" oder "reichlich Knochen" waren in der Regel bei Fischmehlen zu finden, deren Gehalt an verfügbarem Lysin unter dem Mittelwert lag (z. B. Probe Nr. 1, 4 oder 7). Der Aschegehalt sollte bei Heringsmehl 29 %, bei Dorschmehlen 32 % nicht überschreiten. In den bereits genannten Richtlinien der deutschen Fischindustrie wird aber auch ein Mindestgehalt an phosphorsaurem Kalk von 15 % (Dorschmehl: 18 %, Heringsmehl: 8 %) als qualitätsbestimmender Bestandteil gefordert. Für Mehle, bei denen der Rohaschegehalt unter dieser Norm liegt, z. B. Proben-Nr. 10, 13, 22 oder 24, ist anzunehmen, daß sie diese Forderung nicht erfüllen. Bei einem Korrelationsfaktor von $r = -0,10$ war die Beziehung zwischen dem Rohaschegehalt und dem Anteil an verfügbarem Lysin statistisch nicht zu sichern ($3\text{ mr} = 0,61$).

Der Wassergehalt (24 Untersuchungen) betrug im Durchschnitt 8,0 % (7,2 - 10,2 %). Er lag somit an der unteren Grenze des für Lagerungsverluste an verfügbarem Lysin (und anderen Aminosäuren) angegebenen günstigen Bereiches

^{†)} Für die Durchführung der mikroskopischen Untersuchungen möchten wir der Landwirtschaftlichen Untersuchungs- und Forschungsanstalt Bonn, besonders aber Herrn Dr. Vöhringer herzlich danken.

(12-14 %) (siehe Seite 22) und innerhalb der gesetzlich geduldeten Grenze von 14 %.

32. Tierkörpermehle

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals eine größere Anzahl von handelsüblichen Tierkörpermehlen inländischer Produktion auf den Gehalt an verfügbarem Lysin untersucht. Dabei sollte vor allem die prinzipielle Brauchbarkeit der Methode bei Tiermehlen geprüft werden. Weiterhin wurden an einem großen Probenmaterial Unterschiede in der Proteinqualität festgestellt und eventuell vorhandene Beziehungen zu bisherigen Qualitätsmaßstäben, wie Rohprotein-, Rohfett- oder Rohaschegehalt, untersucht. Es waren auch bei Tierkörpermehlen wertvolle Hinweise durch die DNFB-Methode auf optimale bzw. mangelhafte Herstellungs- und Lagerungsmaßnahmen zu erwarten.

Technisch bot der Analysenablauf keinerlei Schwierigkeiten, so daß die Methode ohne Abänderungen anwendbar ist. Die durchschnittlichen Hydrolysenverluste an DNP-Lysin-Standard waren mit 4,1 % des Sollwertes (Mittel von acht Doppelbestimmungen an zwei verschiedenen Mehlen) erfreulich niedrig. Auch bei den Tierkörpermehlen wurde auf die Anwendung eines Ausgleichsfaktors für Hydrolysenverluste verzichtet.

Die Ergebnisse der Untersuchungen an 45 Tierkörpermehlen sind in der Tabelle Nr. 7 zusammengestellt. Der Rohproteingehalt der Proben betrug im Mittel 59,4 % (47,4 - 68,5 %). Nur zwei der Tiermehle (Nr. 1 und Nr. 2) lagen unter dem vom Gesetzgeber (1. Verordnung zum Tierkörperbeseitigungsgesetz) geforderten Mindestgehalt von 50 %. Beide Mehle zeichneten sich durch einen hohen Knochenanteil (1/2 bzw. 1/3) und einen starken Aschegehalt aus. Die nach Angaben der Literatur zu erwartende negative Korrelation von Rohprotein- und Rohaschegehalt ($r = 0,45$) war für $P 0,05$ (bei 24 Freiheitsgraden) gesichert (t - Test nach FISHER).

Der Mittelwert für den Gehalt an DNFB-verfügbarem Lysin (g/16gN) betrug 3,73 % (2,70 - 4,46%). Andere Autoren (z. B. 91) geben für vergleichbares Untersuchungsmaterial (Fleischmehl bzw. Fleischknochenmehl) 3,7 - 6,5 % verfügbares Lysin (g/16gN) an. Manche der extrem niedrigen Gehaltswerte an DNFB-verfügbarem Lysin lassen sich aus der Zusammensetzung und dem Rohnährstoffgehalt allein nicht erklären. Es müssen in diesen Fällen für den niedrigen Anteil an verfügbarem Lysin vor allem die Herstellungsmethoden verant-

Tabelle 7: Gehalt an Rohnährstoffen und verfügbarem Lysin (g/16gN) in 45 Proben Tierkörpermehle
(Die Proben wurden nach steigendem Rohproteingehalt geordnet)

Nr.	Roh- protein Nx6,25	Roh- fett %	Roh- asche %	verfüg.		Ergebnis einer mikroskopischen Beurteilung ⁺
				Lysin	(g/16gN)	
1	47,4	-	31,8	3,40		Reinheit u. Frische nicht zu beanst., besteht zur Hälfte a. Knochen
2	49,3	-	-	3,55		Erhöhter Besatz mit Mageninhaltsstoffen, 1/3 Knochen
3	52,0	-	18,5	2,87		Guter Frischezustand, erh. Besatz m. Mageninhaltsstoffen
4	52,0	2,7	30,3	3,48		Viel Knochen, erh. Besatz m. Mageninhaltsstoffen
5	52,1	-	-	4,20		Keine näheren Angaben
6	52,9	-	19,8	3,46		Frischezustand gut, zuviel Mageninhaltsstoffe
7	54,3	-	-	3,48		Keine näheren Angaben
8	54,8	-	-	2,70		Erhöhter Besatz m. Mageninhaltsstoffen u. Knochen
9	55,5	-	-	4,45		Keine näheren Angaben
10	55,6	-	22,8	3,56		Gehalt an Mageninhaltsstoffen u. Tierhaaren erhöht
11	55,9	-	21,6	2,93		Frischezustand gut, zuviel Mageninhaltsstoffe
12	56,0	-	31,3	3,64		Guter Frischezustand
13	57,0	11,2	25,4	3,72		Keine näheren Angaben
14	57,7	10,2	23,4	3,57		Reinheit und Frische nicht zu beanstanden
15	58,2	-	31,4	4,12		" "

⁺) Ein Teil der Proben und Ergebnisse einer mikroskopischen Beurteilung wurden freundlicherweise von der Landwirtschaftlichen Untersuchungs- und Forschungsanstalt Augustenberg zur Verfügung gestellt. Wir möchten dafür Herrn Dr. Kummer auch an dieser Stelle sehr herzlich danken.

Nr.	Roh- protein Nx6,25	Roh- fett %	Roh- asche %	verfüg- Lysin (g/16gN)	Ergebnis einer mikroskopischen Beurteilung	
16	58,3	-	23,5	3,45	Reinheits- und Frischezustand gut, Gehalt an Mageninh. etw. erh.	
17	58,3	9,0	26,9	4,01	Reinheit u. Frische nicht zu beanstanden, 1/5 Knochen	
18	58,7	13,5	17,7	3,49	Keine näheren Angaben	
19	59,1	-	27,1	3,74	Zuviel Mageninhaltsstoffe, Frischezustand gut	
20	59,3	-	22,7	2,95	Frische gut, zuviel Mageninhaltsstoffe u. Tierhaare	
21	59,3	-	26,4	3,93	Guter Frischezustand, wenig Mageninhaltsstoffe u. Tierhaare	
22	59,4	-	28,7	3,54	Reinheit und Frische nicht zu beanstanden	
23	59,4	-	-	3,96	Keine näheren Angaben	
24	59,4	-	-	4,26	"	
25	59,5	-	-	4,03	"	
26	59,6	-	27,3	3,62	Guter Reinheits- u. Frischezustand	
27	59,8	-	-	4,40	Keine näheren Angaben	
28	60,1	-	22,2	3,49	Zuviel Mageninhaltsstoffe und Tierhaare	
29	60,7	-	21,1	3,38	Reinheit und Frische gut	
30	60,8	4,9	26,5	3,32	"	
31	60,8	-	-	4,46	Keine näheren Angaben	
32	60,9	-	22,2	3,53	Zuviel Tierhaare, guter Frischezustand	
33	61,2	-	-	3,55	Keine näheren Angaben	
34	61,7	-	20,6	3,78	Guter Frischezustand, zuviel Tierhaare	
35	63,3	7,0	21,2	3,65	Erhöhter Besatz mit Mageninhaltsstoffen u. Tierhaaren, Frische gut	

Fortsetzung Tabelle 7

Nr.	Roh- protein Nx6,25	Roh- fett %	Roh- asche %	verfüg- Lysin (g/16gN)	Ergebnis einer mikroskopischen Beurteilung	
36	63,3	10,2	14,5	3,95		
37	63,7	15,7	21,1	3,63	"	Reinheit und Frische gut, wenig Knochen, gute Ware
38	63,7	-	18,3	4,08	"	"
39	64,0	5,8	25,3	3,86	"	"
40	66,7	-	-	3,91	Keine näheren Angaben	
41	67,4	-	-	3,90	Keine näheren Angaben	
42	67,4	-	-	3,90	"	
43	67,8	5,2	17,4	4,10	"	
44	68,1	5,1	16,9	4,04	"	
45	68,5	-	-	4,22	Guter Reinheits- und Frischezustand, gute Ware	

wortlich gemacht werden. Übereinstimmend mit dem Befund anderer Autoren konnte keine gesicherte Korrelation zwischen dem Rohproteinanteil und dem Gehalt an verfügbarem Lysin gefunden werden ($r = 0,31$; $3mr = 0,41$). Es gelang auch PRITCHARD und Mitarbeitern (113) nicht, eine Beziehung zwischen dem Wert für DNFB-verfügbares Lysin und dem Anteil an Rohfett bzw. Rohprotein bei Fleischknochenmehlen nachzuweisen.

Dreißig der untersuchten Proben enthielten im Mittel 23,5 % Rohasche (14,5 - 31,8 %). Dabei lagen 40 % der Mehle über dem von RICHTER und Mitarbeitern (118) angegebenen Höchstwert von 25 %. Eine deutliche Korrelation zwischen dem Rohaschegehalt und dem Anteil an verfügbarem Lysin konnte nicht gefunden werden ($r = 0,19$ und $3mr = 0,56$). Dieser Befund scheint die Ansicht von SATHE und Mitarbeitern (125, 126) zu unterstützen, daß der Ascheanteil erst in zweiter Linie für die Qualitätsbeurteilung der Mehle ausschlaggebend ist.

Ähnliche Verhältnisse wie bei der Rohasche galten auch für den Rohfettgehalt. Hier lag der Mittelwert bei 8,4 % (2,7 - 15,7 %). Tierkörpermehle mit weniger als 3 % Fett (Nr. 4) sind schlecht zu verarbeiten (zu staubig) und daher als technisch ungünstig zu beurteilen (108). Von zwölf untersuchten Proben überstiegen fünf in ihrem Rohfettanteil die in der 1. Verordnung zum Tierkörperbeseitigungsgesetz festgelegte Höchstgrenze von 10 %. Auch eine Beziehung des Rohfettgehaltes zum Gehalt an verfügbarem Lysin ließ sich statistisch nicht absichern ($r = 0,36$ und $3mr = 0,79$). Das mag daran liegen, daß die Anzahl der Proben für eine derartige Berechnung zu gering war.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß bei der Bewertung von Tierkörpermehlen für ihren Einsatz als Ergänzungsfuttermittel die Methode zur Bestimmung des verfügbaren Lysins, besonders im Hinblick auf häufig noch veraltete Herstellungsanlagen, als zusätzliches Kriterium eingeführt werden sollte. Dies gilt, obwohl durch den physiologisch unwirksamen Hydroxylsylananteil aus der Kollagenfraktion der Tiermehle der systematische Fehler für die Bestimmung von DNFB-verfügbarem Lysin etwas erhöht wird.

33. Magermilchpulver und Milchprodukte

Als erste haben SCHÖBER und PRINZ (127) mit Hilfe der von ihnen modifizierten Dinitrofluorbenzolmethode Milchprodukte untersucht. Seitdem gilt diese Modifikation als besonders geeignet zur Bewertung der Proteinquali-

tät von Milchprodukten (102, 110, 121). Bei diesem Verfahren wird noch kein Blindwert durch Reaktion des Lysins mit Chlorkohlensäuremethylester gewonnen, so daß etwas zu hohe Gehaltswerte erhalten werden.

Über die Anwendung der von CARPENTER verfeinerten Methode (1960) bei Milchprodukten wurde inzwischen von CLEGG sowie von ERBERSDOBLER und ZUCKER (29, 39, 40) berichtet. Die Versuche an den Testgemischen aus Casein und Glukose hatten gezeigt, daß die etwas vereinfachte Methode nach CARPENTER zur Ermittlung des Gehalts an verfügbarem Lysin in Milchprodukten brauchbar ist. Daraufhin wurden Untersuchungen an einer großen Anzahl Milchpulverproben mit gutem Erfolg durchgeführt.

Die Hydrolysate der Milchpulverproben waren deutlich bräunlich verfärbt. In den Kolben bildete sich während der Hydrolyse ein schwarzer schmieriger Belag. Die Extinktionen der Blindwertproben lagen deutlich höher als bei den Fischmehl- und Tierkörpermehlhydrolysaten, ebenso war die Fehlerbreite des Verfahrens größer, wie es sich auch in der etwas höheren Wiederholungsstreuung für Milchpulver zeigt (siehe Seite 41).

Die an drei verschiedenen Milchpulverproben in wiederholten Versuchen mit Hilfe von DNP-Lysin-Standard ermittelten Hydrolysenverluste lagen im Durchschnitt bei 7,1 % (4,2 - 10,1 %). Sie stiegen in deutlicher Abhängigkeit von der angewandten Salzsäurekonzentration. Die Verluste sind damit noch keineswegs als zu groß anzusehen, wenn sie auch deutlich höher als z. B. bei Fischmehl liegen.

Die Gehaltswerte an Rohprotein und verfügbarem Lysin sind in Tabelle 8 aufgeführt. Der Anteil an Rohprotein betrug 33,8 % (30,1 - 36,0 %) bei einem Gehalt an DNFB-verfügbarem Lysin von 6,28 % (5,07 - 7,05 %). Die Gehaltszahlen für Rohprotein und verfügbares Lysin zeigten eine schwache, doch statistisch gesicherte Korrelation ($r = 0,52$ und $3mr = 0,38$; im t-Test bei $P 0,01$ signifikant). Bei dieser Feststellung ist zu beachten, daß es sich in der Mehrzahl um eine sehr gute und ausgeglichene Ware handelte. Die Proben 1 - 25 stellen 5 Gruppen zu je 5 Proben verschieden lange gelagerter Trockenmilchchargen (1959-1963) aus den Beständen des Berliner Senats dar (siehe Tabelle 8) ⁺. Bis auf die Jahresgruppe 1962 ergab sich mit zunehmender Lagerungsdauer ein geringer aber deutlicher Abfall an verfügbarem Lysin. Die Proben der Jahresgruppe 1962 können nicht in die Untersuchungen mit einbezogen werden, da es sich bei 4 der 5 untersuchten Proben um Walzenware handelte. Eine Nachuntersuchung nach einer Lagerungszeit von weiteren 14 Monaten ergab für alle Milchpulver einen im

Tabelle 8: Gehalt an Rohprotein (Nx6, 25) und an verfügbarem Lysin (g/16gN) in 33 Proben Trockenmagermilch

Proben Nr.	Rohprotein (Nx6, 25)	% verf. Lysin (g/16gN)	Art der Herstellung	Datum
1	33,6	6,58	Sprüh	1963
2	33,2	6,48		
3	33,6	6,49		
4	34,4	6,57		
5	32,3	6,84		
6	33,0	5,58	Walze	1962
7	34,0	6,12		
8	35,0	6,40		
9	33,1	6,25		
10	34,4	6,00	Sprüh	
11	32,4	6,45		
12	33,9	6,31	Sprüh	1961
13	34,3	6,71		
14	34,2	7,05		
15	34,3	6,06		
16	34,9	6,33		
17	33,7	6,32	Sprüh	1960
18	33,4	6,23		
19	34,0	6,26		
20	33,7	6,50		
21	33,1	5,53	Sprüh	1959
22	33,0	6,42		
23	33,6	6,13		
24	33,7	6,26		
25	32,7	6,61		
26	35,5	5,07	Walze	1966
27	34,8	5,46		
28	30,1	6,84		
29	33,5	6,14		
30	35,7	6,19		
31	33,8	6,80	Sprüh	1966
32	35,0	6,42		
33	36,0	6,00	Walze	

Rangsummentest nach WILCOXON für $\alpha = 0,01$ signifikanten weiteren Abfall an DNFB-verfügbarem Lysin. Damit stimmen die Ergebnisse genau mit dem am gleichen Untersuchungsmaterial erhobenen Untersuchungsbefund von ERBERSDOBLER und ZUCKER (40) überein. ⁺⁺)

Sämtliche Proben wiesen einen Wassergehalt von 6,0 - 7,8 % auf. Damit liegt der Wassergehalt schon in einem Bereich, in dem nach GÖRNHARDT (51) die Maillardreaktion besonders rasch verläuft. Die untersuchten werksfrischen Proben enthielten im Mittel um 5,3 % Wasser. Trotz dieses ungünstigen Wassergehalts sind die Lysinverluste, gemessen an Angaben anderer Autoren (9, 64, 117), relativ gering. Dies dürfte auf die sorgfältigen Lagerungsbedingungen zurückzuführen sein.

Die untersuchten Proben walzengetrockneter Magermilch enthalten wesentlich weniger Lysin als die untersuchten Muster Sprühtrockenmilch. Dies spricht dafür, daß die Walzentrocknung der Magermilch insgesamt etwas weniger schonend ist als die Sprühtrocknung. Dennoch ist es auch mit Hilfe der Walzentrocknung möglich, Milchpulver von hoher Proteinqualität herzustellen.

Untersuchungen an Milch und Milchprodukten

Um den Verlauf, bzw. den Zeitpunkt für den Eintritt der Lysinverluste während der Milchpulverproduktion kennenzulernen, untersuchten wir wiederholt Proben von frischer Magermilch, je ein Sprüh- bzw. Walzenkonzentrat und je ein fertiges Pulver derselben Charge. Die flüssigen Proben wurden vor der Untersuchung gefriergetrocknet. Aus den Mittelwerten all dieser Bestimmungen läßt sich erkennen, daß auch bei sehr schonender Milchpulverherstellung nachweisbare Verluste an verfügbarem Lysin auftreten. Bei der technischen Trocknung von Milch war ein Abfall an Lysin in der Reihenfolge Magermilch, Milchkondensat, sprühgetrocknetes und zuletzt walzengetrocknetes Milchpulver vorhanden. Im ganzen unterstreichen die Ergebnisse die Bedeutung, die die gegenseitige Beziehung von Höhe und Dauer der Temperatureinwirkung für die

⁺⁺) Die bei ERBERSDOBLER und ZUCKER (40) angegebenen Gehaltszahlen sind insgesamt etwas höher, da dort aus Gründen des Vergleichs zum Fischmehlprotein der um ca. 3 % höhere Hydrolysenverlust (7 % statt 4 %) ausgeglichen worden war.

⁺) Wir danken dem Senator für Wirtschaft des Berliner Senats für die Überlassung des ausgezeichneten Probenmaterials.

Qualität der Milchpulver hat. Sie beweist außerdem die hervorragenden Dienste, die die Dinitrofluorbenzolmethode für die Überprüfung derartiger Prozesse zu leisten vermag.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden einige orientierende Analysen an Proben frischer Milch (9 Proben Vorzugsmilch) zur Bestimmung ihres Gehaltes an DNFB-verfügbarem Lysin durchgeführt. Die gefundenen Gehaltszahlen lagen im Mittel bei 7,1 % (g/16gN), (6,9 - 7,3 %).

Als drittes Problem interessierte der Einfluß einer Gefriertrocknung auf den Gehalt an DNFB-verfügbarem Lysin. Dies vor allem, weil DVORAK und VOGNAROVA (33) von ausgeprägten Lysinverlusten bei der Gefriertrocknung von Fleisch berichten. Während MÜLLER (100) die tertiäre Struktur der Proteine nach Gefriertrocknung noch erhalten fand, wird nach NEMITZ (zit. n. 103) die spezifische Struktur der Eiweißkörper an den Verbindungsstellen der Aminosäuren gelockert. Das soll eine verminderte Löslichkeit der Pulver und eine gesteigerte Reaktionsbereitschaft der Seitengruppen im Proteinmolekül bedingen. HOSTETTLER und Mitarbeiter (66) sowie LANG und Mitarbeiter (78) fanden für lyophilisierte Milch als einziger Proteinquelle die gleiche biologische Wertigkeit wie für Frischmilch. Doch zeigten ihre ausgedehnten elektronenmikroskopischen und papierchromatographischen Untersuchungen deutliche Casein-Konglomeratbildungen und Verschiebungen im elektrophoretischen Muster der Milchproteine. Diese Veränderungen ließen sich auch durch Wiederauflösen der Pulver nicht rückgängig machen.

Eigene Untersuchungen zum Gehalt an verfügbarem Lysin für rohe Vorzugs-, pasteurisierte Trink- und Buttermilch erbrachten für alle drei Probenarten im gefriergetrockneten Zustand jeweils deutlich höhere Werte (im Mittel um 7,2 %). Dies spräche allgemein für die Annahme von NEMITZ einer gesteigerten Reaktionsbereitschaft der Proteine. Allerdings scheinen die Unterschiede zu gering zu sein, um ernährungsphysiologisch ins Gewicht zu fallen (beim Einsatz als einzige Proteinquelle). Ihr Vorhandensein sollte, nach Festigung dieser Ergebnisse durch eine größere Probenzahl, bei der Interpretation von Ergebnissen an lyophilisierten Proben beachtet werden.

34. Eiweißkonzentrate

Fünfzehn aus dem Handel gezogene Eiweißkonzentrate für Schweine (Mischfuttermittel) wurden auf ihren Gehalt an Rohprotein und verfügbarem Lysin un-

tersucht. Bei allen Proben zeigte sich kurz nach Hydrolysenbeginn eine dunkle Verfärbung des Hydrolysats und ein kohligter Rückstand in den Hydrolysenkölbchen. Hauptsächlich dürften diese Erscheinungen auf kohlenhydratreiche Futtermittel (z. B. Sojaschrot, Molkenpulver und Grünmehle) zurückzuführen sein. Hydrolysenverluste an zugegebenem DNP-Lysin waren überraschend niedrig. Sie lagen mit durchschnittlich 4,8 % des Sollwertes in der für Fischmehle oder Tierkörpermehle gefundenen Größenordnung. Im allgemeinen boten die Analysen keine technischen Schwierigkeiten. Das deutet auf eine grundsätzliche Anwendbarkeit der CARPENTER-Methode auch bei Mischfuttermitteln mit hohem Rohprotein- und Lysingehalt hin. Die ermittelten Ergebnisse sind in der Tabelle Nr. 9 zusammengefaßt.

Der durchschnittliche Rohproteingehalt lag bei 52,4 % (47,7 - 56,2 %). Ihm entsprach ein Mittelwert an DNFB-verfügbarem Lysin von 5,62 % im Rohprotein (4,94 - 6,58 %). Der Rohprotein- und Lysingehalt sind durch eine gesicherte Korrelation ($r = 0,95 \pm 0,025$; 3 mr = 0,075) verbunden. Dies spricht für die Verwendung von zumeist gleichmäßigem Rohmaterial. Durch einen extrem hohen Lysingehalt fielen die Proben Nr. 11, 6 und 15, durch einen Mindergehalt Nr. 1, 7 und 8 auf.

Die Beziehung zwischen dem ermittelten und dem nach der Zusammensetzung aus Tabellenwerten errechneten Gehalt an DNFB-verfügbarem Lysin und an Rohprotein ergab einen höheren Gehalt sowohl für das Rohprotein (+2,5 %) als auch für verfügbares Lysin (+9,8 %). Auch daraus läßt sich erkennen, daß grundsätzlich gutes Ausgangsmaterial vermischt wurde. Schwankungen im Lysingehalt bei verschiedenen Proben lassen sich nur durch Verwendung teilweise sehr unterschiedlichen Rohmaterials erklären. Dies unterstreicht die Notwendigkeit einer gezielten Rohwarenkontrolle über eine Rohproteinbestimmung hinaus.

Um die Möglichkeit zu untersuchen, inwieweit man aus dem Gehalt an lysinreichem Material (Fischmehl und Sojaschrot) auf den zu erwartenden Lysingehalt der Mischung schließen kann, wurde die gegenseitige Abhängigkeit dieser beiden Merkmale geprüft. Der ermittelte Korrelationskoeffizient ($r = 0,68 \pm 0,14$ und 3 mr = 0,41) deutet grundsätzlich diese Möglichkeit an; vor allem dann, wenn allgemein nur gleichmäßig gute Qualitäten verarbeitet werden.

Tabelle 9: Gehalt an Rohprotein (Nx6, 25) und verfügbarem Lysin (g/16gN) sowie Zusammensetzung von 15 Proben Eiweißkonzentraten (die Proben wurden nach steigendem Rohproteingehalt geordnet)

Proben Nr.	% Rohprotein (Nx6, 25)	% verfügbares Lysin (g/16gN)	Gehalt an den wichtigsten Mischkomponenten (in %)						
			Fischmehl	Tierkörper-	Soja-	Erdsuß-	Gras-		
			Dorschmehl	mehl	schrot	schrot	Luzerne-		
			Heringsmehl	Fleischfutter-					grünmehl
			Solubles	mehl					
1	47,7	4,94	44	23	20	-	-	6	
2	48,8	5,45	40	14	30	-	-	9	
3	49,8	5,56	40	10	30	10	-	-	
4	50,3	5,45	50	10	24	-	-	6	
5	51,0	5,66	60	10	10	5	-	3	
6	51,9	6,17	50	-	39	-	-	-	
7	52,1	5,35	40	10	25	15	-	-	
8	52,2	5,35	45	18	30	-	-	-	
9	52,2	5,56	52	8	20	10	-	-	
10	52,6	5,45	40	10	31	10	-	-	
11	52,8	6,58	50	-	39	-	-	-	
12	54,4	5,56	58	4	25	-	-	3	
13	55,6	5,45	75	20 % Molkenpulver			-	-	
14	56,2	5,86	50	5	27	5	-	3	
15	57,8	5,97	66	-	18	-	-	4	

D. SCHLUSS

Die absolute Signifikanz aller bis heute ausgearbeiteten Methoden zur Bewertung der Proteinqualität liegt etwa in der gleichen Größenordnung (102). Die Wahl eines bestimmten Verfahrens richtet sich allein nach der angestrebten Information und den jeweils vorhandenen technischen Möglichkeiten. Welchen Informationswert können wir von der Bestimmungsmethode für DNFB-verfügbares Lysin erwarten?

1. Sie erbringt eine aussagefähige Angabe für die immer notwendiger werdende Rohwarenkontrolle.
2. Sie liefert bei vergleichbarem Ausgangsmaterial schnell verfügbare und gut reproduzierbare Hinweise über evtl. stattgefunden Proteinschädigungen durch Verarbeitungs- und Lagerungsmaßnahmen.
3. Sie gestattet ausreichend sicher für den praktischen Fütterungseinsatz eine physiologisch adäquate Beurteilung von Eiweißfuttermitteln hinsichtlich ihrer Ergänzungswirkung an Lysin.

Grundsätzlich kann ihre Anwendbarkeit auch auf kohlenhydratreiche Mischfuttermittel (bei genügendem Rohprotein- und Lysingehalt) als gegeben angesehen werden. Für jede neue, bisher nicht untersuchte Materialqualität sollten Versuche über die optimal zu gestaltende Hydrolyse und die dabei auftretenden Verluste an DNFB-verfügbarem Lysin unternommen werden.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Trotz der anerkannten Brauchbarkeit der Dinitrofluorbenzolmethode zur Bestimmung des verfügbaren Lysins schien es wichtig, einige der technischen und analytischen Probleme näher zu untersuchen.

Nach Besprechung der Literatur über die Möglichkeit einer Proteinbewertung an Hand des Aminosäurenmusters wird auf das Problem Proteinqualität und Hitze einwirkung besonders im Hinblick auf eine Aminosäurenverfügbarkeit, näher eingegangen. Hierbei wird die Sonderstellung der essentiellen Aminosäure Lysin und die Möglichkeit, vom Gehalt an DNFB-verfügbarem Lysin auf den Futterwert von Proteinen schließen zu können, diskutiert. Eine eingehende Darstellung findet der Analysenverlauf mit den dabei auftretenden Problemen. Die wichtigsten Eiweißfuttermittel (Fischmehl, Tierkörpermehl, Magermilchpulver und Eiweißkonzentrat) werden in ihren Besonderheiten bezüglich einer Proteinqualität und Proteinbewertung besprochen.

Untersuchungen zum Analysenverfahren weisen auf den schützenden Einfluß eines Überschusses an Dinitrofluorbenzol (0,3 ml/250 mg Untersuchungsgut) bei der Bestimmung von DNFB-verfügbarem Lysin in kohlenhydratreichem Material hin. Für derartige Bestimmungen empfiehlt sich die Verwendung größerer Mengen einer schwächer konzentrierten Salzsäure als bisher üblich (30 ml 7,75 n statt 25 ml 8,1 n). Untersuchungen an Testgemischen aus lysin- und kohlenhydratreichen Gemengteilen zeigten die grundsätzliche Brauchbarkeit der Dinitrofluorbenzolmethode auch bei kohlenhydratreichen Proben.

Analysen in verschiedenen Eiweißfuttermitteln zum Gehalt an Rohprotein und DNFB-verfügbarem Lysin erbrachten folgende Ergebnisse:

	Proben- zahl	Rohprotein (gNx6,25)	DNFB-verfügbares Lysin g/16gN
Fischmehl	34	62,2 (34,4-70,8)	5,78 (3,61-6,77)
Tierkörpermehl	45	59,4 (47,4-68,5)	3,73 (2,70-4,46)
Magermilchpulver	33	33,8 (30,1-36,0)	6,28 (5,07-7,05)
Eiweißkonzentrat	15	52,4 (47,7-56,2)	5,62 (4,94-6,58)

Der Anwendungsbereich und die Aussagekraft der Methode werden jeweils diskutiert.

Die Bestimmung von DNFB-verfügbarem Lysin nach CARPENTER wird vor allem zur Rohwaren- und Verfahrenskontrolle sowie zur Beurteilung des Ergänzungswertes von Eiweißfuttermitteln empfohlen.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Abderhalden, E., W. Stix Hoppe Seyl, Z. 129, 143 (1923)
2. Allison, J. B. Advances in Protein Chemistry 5, 155 (1949)
3. Anson, M. L.,
A. A. Altschul "Processed Plant Protein Foodstuffs"
Academic Press New-York, London
1958 Chapt. 1
4. Baliga, B. P.
M. E. Bayliss, C. M. Lyman Arch. Biochem. Biophys. 84, 1
(1959)
5. Barber, R. S., R. Braude,
A. G. Chamberlain,
Z. D. Hosking,
K. G. Mitchell Brit. J. Nutr. 18, 545 (1964)
6. Bird, H. R.,
F. H. Steinke,
T. D. Runnels Poultry Sci, 41, 1740 (1962)
7. Bissett, H. M., H. L. A. Tarr Poultry Sci. 33, 250 (1954)
8. Block, R. J., P. R. Cannon,
R. W. Wissler, C. H. Steffee,
R. L. Straube, L. E. Frazier,
R. L. Woolridge Arch. biochem. 10, 295 (1946)
9. Bock, H. -D., J. Wünsche Die Nahrung, 9, 131 (1965)
10. Boyne, A. W., K. J. Car- J. Sci, Fd. Agric. 12, 832 (1961)
penter, A. A. Woodham
11. Bruno, D., K. J. Carpenter Biochem. J. 67, 13p (1957)
12. Bürke, R. P. S. Afric. J. Agric. Sci, 4, 63 (1961)
13. Bürke, R. P. Kraftfutter 48, 677, (1965)
14. Bunyan, J., S. A. Price J. Sci. Fd. Agric. 11, 25 (1960)
15. Bunyan, J., A. A. Woodham Brit. J. Nutr. 18, 537 (1964)
16. Calhoun, W. K., F. N. Hep- J. Nutr. 70, 377 (1960)
burn, W. B. Bradley
17. Cannon, P. R., C. H. Steffee Jr. Federation Proc. 6, 390 (1947)
lt., D. A. Rowley, R. C. Stept

18. Carpenter, K. J., G. M. Ellinger Biochem. J. 61, xi (1955)
19. Carpenter, K. J., Poultry Sci. 34, 1451 (1955)
G. M. Ellinger
20. Carpenter, K. J., G. M. Ellinger, D. H. Shrimpton J. Sci. Fd. Agric. 6, 296 (1955)
21. Carpenter, K. J., W. L. Jones, E. L. Mason Biochem. J. 73, 11p (1959)
22. Carpenter, K. J., Biochem. J. 77, 604 (1960)
G. M. Ellinger
23. Carpenter, K. J., Brit. J. Nutr. 15, 403 (1961)
B. E. March
24. Carpenter, K. J., C. B. Morgan, C. H. Lea, L. J. Parr Brit. J. Nutr. 16, 151 (1962)
25. Carpenter, K. J., C. H. Lea, L. J. Parr Brit. J. Nutr. 17, 151 (1963)
26. Chang, V. O. J. Nutr. 78, 21 (1962)
27. Choppe, W., F. H. Kratzer Poultry Sci. 42, 642 (1963)
28. Clark, J., D. J. Rittenberg J. biol. chem. 189, 521 (1951)
29. Clegg, K. M. Brit. J. Nutr. 14, 325 (1960)
30. Conkerton, E. J., Arch. Biochem. Biophys. 81,
V. L. Frampton 130 (1959)
31. Denton, A. E., C. A. Elvehjem J. biol. chem. 206, 455 (1954)
32. Denton, A. E., J. biol. chem. 206, 449 (1954)
C. A. Elvehjem
33. Dvorak, Z., J. Sci. Fd. Agric. 16, 305 (1965)
J. Vognarova
34. Donoso, G., O. A. Lewis, D. S. Miller, P. R. Payne J. Sci. Fd. Agric. 13, 192 (1962)

35. Eastoe, J. E. Biochem. J. 61, 589 (1955)
36. Eggum, B. O. Z. Tierern. u. Futtermittelk. 22, 32 (1967) (Vortragsreferat)
37. Erbersdobler, H. Vet. Med. Diss. München, (1962)
38. Erbersdobler, H., R. Wellhäuser, G. Pfeiffer Paper auf dem 12th European meeting of meat research workers in Sandefjord, Norwegen (1966) vorl. Mitteilung
39. Erbersdobler, H., H. Zucker Kraftfutter 48, 161 (1965)
40. Erbersdobler, H., H. Zucker Milchwiss. 21, 564 (1966)
41. Ericson, L. E., S. Larsson, G. Lid Acta physiol. scand. 53, 366 (1961)
42. Ericson, L. E., S. Larsson, C. O. Östholm Acta physiol. scand. 12, 157 (1962)
43. Evans, R. J., H. A. Butts Science 109, 569 (1949)
44. Fischer, H., P. Grimminger, Brit. J. Nutr. 71, 213 (1960)
45. Ford, J. E. Brit. J. Nutr. 14, 485 (1960)
46. Ford, J. E. Brit. J. Nutr. 16, 409 (1962)
47. Ford, J. E. Brit. J. Nutr. 18, 449 (1964)
48. Fraenkel-Conrat, H., J. Harris, A. L. Levy "Methods of Biochemical Analysis" Vol. 2 Chapt. 10 Interscience Publishers New-York (1958)
49. Friedmann, L., O. L. Kline J. Nutr. 40, 295 (1950)
50. Friedmann, L., O. L. Kline J. biol. chem. 184, 595 (1950)
51. Görnhardt, L., Fette, Seifen, Anstrichmittel 57, 270 und 429 (1955)
52. Grau, C. R., M. Kamei J. Nutr. 41, 89 (1950)

67. Jones, J. D. J. Nutr. 84, 313 (1964)
68. Jones, A. S., A. Cadenhead J. Sci. Fd. Agric. 16, 38 (1965)
69. Justisz, M., L. Penasse Bull. soc. clin. biol. 34, 480 (1952)
70. Karte, H., Milchwiss. 11, 420 (1956)
71. Kellenbarger, S., Poultry Sci. 40, 1756 (1961)
72. Kofranyi, E., Naturwissenschaften 37, 91 (1949)
73. Krampitz, G., Z. Tierern. u. Futtermittelk. 15, 227 (1960)
74. Kratzer, F. H., N. Green Poultry Sci. 36, 562 (1957)
75. Kuiken, K. A., C. A. Lyman J. Nutr. 36, 359 (1948)
76. Kummer, H. Tkv.-Nachrichten 11, Sonderdruck (1961)
77. Lang, K. "Wissenschaftliche Veröffentlichung der Deutschen Gesellschaft für Ernährung" 3. Symposium 1959, Steinkopff-Verlag Darmstadt (1960)
78. Lang, K., C. Czok, A. Fricker, W. Griem, W. Kieckebusch, E. Krieg, W. Pabst Milchwiss. 20, 309 (1955)
79. Lea, C. H., R. S. Hannan Biochim. Biophys. Acta 3, 313 (1949)
80. Lea, C. H., R. S. Hannan Biochim. Biophys. Acta 5, 433 (1950)
81. Lea, C. H., R. S. Hannan Nature 168, 744 (1951)
82. Lea, C. H., L. J. Parr, K. J. Carpenter Brit. J. Nutr. 12, 297 (1958)
83. Lea, C. H., L. J. Parr, K. J. Carpenter Brit. J. Nutr. 14, 91 (1960)
84. Levy, A. L., C. H. Li J. biol. chem. 213, 487 (1955)
85. Liener, J. E., Altschul A. M. "Processed Plant Protein Foodstuffs" Academic Press New-York, London (1958) Chapt. 5

86. Linko, Y. -Y., J. A. Johnson J. Agric. Fd. Chem. 11, 150 (1963)
87. Longenecker, J. B., Arch. Biochem. Biophys. 84, 46 (1959)
N. L. Hause
88. Lyman, L. M., W. Y. J. Nutr. 49, 679 (1953)
Chang, R. J. Couch
89. Lyman, C. M., M. Federation Proc. Abstr. 23, 186
Thomas (1964)
90. Lyman, C. M., M. J. Assoc. Off. agric. chem. 48, 858
Thomas (1965)
91. Maguire, M. F., Irish J. Agric. Res. 2, 269 (1963)
U. Cotter
92. Mauron, J., F. Mottu, Arch. Biochem. Biophys. 59, 433
R. H. Egli, E. Bujard (1955)
93. Mauron, J., F. Mottu Arch. Biochem. Biophys. 77, 312
(1958)
94. Mauron, J., F. Mottu, J. Agric. Fd. Chem. 10, 512 (1962)
E. V. McCollum, M. Davis
95. Miller, E. L., K. J. Carpenter, C. B. Morgan, Brit. J. Nutr. 19, 249 (1965)
A. W. Boyne
96. Miller, E. L. Brit. J. Nutr. 19, 547 (1965)
K. J. Carpenter, C. K. Milner
97. Miller, E. L., Brit. J. Nutr. 19, 565 (1965)
A. W. Hartley, D. C. Thomas
98. Mitchell, H. H., R. J. J. biol. chem. 163, 599 (1946)
Block
99. Moran, E. T., L. S. Jensen, J. Nutr. 79, 239 (1963)
100. Müller, R. Z. Tierern. u. Futtermittelk. 20, 163
(1965)
101. Munaver, S. M., J. Nutr. 69, 58 (1959)
A. E. Harper

102. National Academy of Sciences, National Research Council "Evaluation of Protein Quality" Publication 1100 Washington (1963)
103. Nieder, H. Landw. Diss, Bonn (1965)
104. Osborne, T. B., J. biol. chem. 17, 325 (1914)
L. B. Mendel
105. Osborne, T. B. J. biol. chem. 22, 244 (1915)
L. B. Mendel
106. Osborne, T. B., J. biol. chem. 25, 1 (1916)
L. B. Mendel
107. Oser, B. L. Albanese A. A. "Protein and Amino Acid Nutrition" Academic Press New-York, London (1959) Chapt. 10
108. Ostertag, v. R., E. Moegle "Die Tierkörperbeseitigung" Paul Parey Verlag Berlin (1958)
109. Patton, A. R., E. G. Hill Science 107, 623 (1948)
110. Pion, R. Ann. Biol. anim. Biochem. Biophys. 1, 296 (1961)
111. Porter, R. R. Biochim. Biophys. Acta 2, 105 (1948)
112. Porter, R. R. Biochem. J. 46, 304 (1950)
113. Pritchard, H., J. Mc. Larnon J. Sci. Fd. Agric. 15, 690 (1964)
R. Gillivray
114. Rao, M. N., H. Sreenivas, J. Sci. Fd. Agric. 8, 544 (1963)
M. Swaminathan, K. J. Carpenter, C. B. Morgan
115. Rao, S. R., F. L. Carter, Anal. Chem. 35, 1927 (1963)
V. L. Frampton
116. Rapp, R. D. Clin. Chem. 9, 27 (1963)
117. Richter, K., K. Schiller Z. Tierern. u. Futtermittelk. 13, 345 (1958)
118. Richter, K., K. L. Cranz, Landwirtschaftliche Forschung 15, 75 (1962)
H. J. Oslage, K. Schiller

119. Riesen, W. N. , D. R. Clandinin, C. A. Elvehjem, W. W. Cravens J. biol. chem. 167, 143 (1947)
120. Rose, W. C. Phys. Revs. 18, 109 (1938) Ref. n. 53
121. Ross, J. , G. Krampitz Z. Tierern. u. Futtermittelk. 15, 95 (1960)
122. Sanger, F. Biochem. J. 39, 507 (1945)
123. Sanger, F. Biochem. J. 45, 563 (1949)
124. Sanger, F. Science 129, 1340 (1959)
125. Sathe, B. S. , R. B. Cumming, G. L. McClymont Austr. J. Agri. Res. 15, 698 (1964)
126. Sathe, B. S. G. L. McClymont Austr. J. Agri. Res. 16, 243 (1965)
127. Schober, R. , I. Prinz Milchwiss. 11, 466 (1956)
128. Schober, R. , W. Christ I. Prinz Milchwiss. 19, 538 (1964)
129. Schormüller, J. , K. H. Müller Z. Lebensmittelunters. u. Forsch. 118, 485 (1962)
130. Schramm, G. , C. Braunitzer Z. Naturforsch. 8b, 61 (1953)
131. Schroeder, W. A. J. Am. Chem. Soc. 74, 5118 (1952)
132. Schwerdtfeger, E. , Z. Tierern. u. Futtermittelk. 16, 262 (1961)
133. Selim, A. S. M. J. Agri. Fd. Chem. 13, 435 (1965)
134. Shillam, K. W. G. , J. H. Roy Brit. J. Nutr. 17, 171 (1963)
135. Slyke, v. D. D. , F. J. Birchard J. biol. chem. 16, 539 (1913)
136. Smith, R. E. , H. M. Scott Poultry Sci. 44, 394 (1965)
137. Smith, R. E. , H. M. Scott Poultry Sci. 44, 401+108 (1965)

138. Stewart, C. P. "Wissenschaftliche Veröffentlichung der Deutschen Gesellschaft für Ernährung" 3. Symposium 1959, Steinkopff-Verlag Darmstadt(1960)
139. Tarr, H. L. A. Nature 171, 344 (1953)
140. Tarr, H. L. A., J. Biely
B. E. March Poultry Sci. 33, 242 (1954)
141. Vogt, H. Arch. Geflügelk. 1, 72, (1964)
142. Vogt, H., K. Stute Arch. Geflügelk. 29, 187 (1965)
143. Waldschmidt-Leitz, G. "Chemie der Eiweißkörper"
Stuttgart (1957)
144. Waterhouse, H. N.,
H. M. Scott Poultry Sci. 41, 1936 (1962)
145. Waterworth, D. G. Brit. J. Nutr. 18, 503 (1964)
146. Williams, M. A., C. R. Grau J. Nutr. 59, 243 (1956)
147. Wünsche, J., H. -D. Bock Arch. Tierern. 15, 2p 103 (1965)
148. Yang, S. P., J. E. Steinhauer
J. E. Masterson J. Nutr. 79, 257 (1963)

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Johannes Brüggemann für die Überlassung des Themas und die angenehmen Arbeitsbedingungen in seinem Institut.

Herrn Dr. H. Erbersdobler (wiss. Ass.) sowie Herrn Univ. Doz. Dr. H. Zucker sei für ihre stetige Hilfsbereitschaft und interessierte Förderung meiner Arbeit an dieser Stelle herzlich gedankt.

Lebenslauf

Am 27. August 1939 wurde ich, Kai-Christian Otte, als zweiter Sohn des Rayon-Veterinärarztes Dr. Friedrich O. Otte und seiner Ehefrau Harriet Marianne, geb. Ulpe, in Riga/Lettland geboren.

In der Volksschule Lenggries/Obb. begann 1945 meine insgesamt 14-jährige Schulzeit, die ich im Juli 1959 mit dem Abitur an der Staatlichen Oberrealschule Hersbruck a. d. Pegnitz beendete.

Zum Sommersemester 1961 schrieb ich mich als Studierender der Tiermedizin bei der Universität München ein, wo ich im Februar 1966 das tierärztliche Staatsexamen ablegte.

